

Caracterização da composição nutricional da macroalga Fucus vesiculosus e a alteração dos compostos bioativos nos diferentes métodos de secagem

Mara Sofia Rodrigues

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por
Doutora Susana Maria Almeida Cardoso
Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

**Bragança
2015**

Agradecimentos

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de várias pessoas, às quais gostaria de agradecer, em particular:

Em primeiro lugar, à Investigadora Doutora Susana Maria Almeida Cardoso, pela orientação, disponibilidade, rigor científico e pelo saber que me transmitiu neste tema que para mim era desconhecido, e que sem ela nada disto teria sido possível.

Ao Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias pela co-orientação, dedicação, paciência, total colaboração em solucionar dúvidas e por todo o apoio que sempre demonstrou ao longo deste percurso.

À Professora Doutora Olívia Rodrigues Pereira, pela amizade, dedicação, apoio e ajuda no laboratório bem como, disponibilização de tempo e informação na fase inicial deste trabalho.

Aos meus amigos e amigas, especialmente à Tatiana Santos e à Narcisa Matos, colegas e família, que, direta ou indiretamente, estiveram ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, força e muitos sorrisos em certos momentos complicados. Com vocês tudo fica mais fácil!

Resumo

Este trabalho incidiu no estudo sobre a composição nutricional da macroalga castanha *Fucus vesiculosus*, tratando-se de uma alga edível da costa Portuguesa. As macroalgas ocupam toda a zona litoral de Portugal e as suas propriedades funcionais e benefícios nutricionais para a saúde Humana dependem da variedade da alga, sazonalidade e/ou área de produção geográfica. No presente estudo, fez-se uma caracterização da composição em macronutrientes (proteína, lípidos e hidratos de carbono), fibra bruta e minerais. Verificou-se que a *F. vesiculosus* é uma boa fonte de compostos nutricionais, tais como a proteína ($11\pm 0,2\%$), elevado teor de minerais, nomeadamente cálcio (810 mg/100g), sódio (3302 mg/100g) e potássio (2771 mg/100g). A alga apresenta também conteúdos baixos de lípidos ($2,8\pm 0,05\%$) e um valor alto de hidratos de carbono.

Sabendo que a composição nutricional pode variar conforme o método de secagem, este estudo avaliou também o efeito de diferentes métodos de secagem (secagem por sombra, liofilização, sol e estufa) na variação do perfil em ácidos gordos. Os resultados obtidos permitiram concluir que, apesar do baixo conteúdo em lípidos, as amostras de alga apresentaram um “bom perfil” ao nível dos conteúdos em PUFA, n3 e n6 (obtiveram-se valores médios de 34,9%, 15,7% e 19,2%, respectivamente), importantes para uma dieta saudável. Verificou-se que, os tratamentos de secagem que permitiram ter maior conteúdo em ácidos gordos PUFA, foram por estufa (42%) e sol (37%); para os ácidos gordos n3, por sol e liofilização ($\approx 21\%$); para ácidos gordos n6, por estufa (31%); para a razão n6/n3, os tratamentos de secagem que mais favoreceram a razão destes conteúdos, foram por sol (0,8%) e liofilização (0,4%).

O estudo efetuado por voltametria cíclica permitiu verificar que, o extrato etanólico da *F. vesiculosus* seca no liofilizador, era o mais enriquecido em compostos fenólicos ($198\pm 12\text{mg}$ equivalente de ácido ascórbico por grama de amostra seca). Apesar disso, este facto não influenciou a capacidade antioxidante dos diferentes extratos da alga, uma vez que, o potencial ($0,61\pm 0,5\text{V}$) correspondente à intensidade máxima do pico anódico foi semelhante em todos os processos de secagem.

Palavras-chave: alga *Fucus vesiculosus*; métodos de secagem; composição em macronutrientes; perfil de ácidos gordos; quantidade em compostos fenólicos; método Weende; cromatografia gasosa; voltametria cíclica.

Abstract

This work focuses on the study of the nutritional composition of brown seaweed *Fucus vesiculosus*, which is an edible seaweed of the Portuguese coast. The macroalgae occupy the entire coastal zone of Portugal and its functional and nutritional benefits to Human health depends on the variety of seaweed, seasonal and/or geographical area of production. In the present study it was made a study on the composition of macronutrients (protein, fats and carbohydrates), crude fiber and minerals. It was found that the *F. vesiculosus* is a good source of nutrition compounds, having a considerable amount of protein ($11.1\pm 0.2\%$), high levels of minerals, particularly calcium (810mg/100g), sodium (3302 mg/100g) and potassium (2771 mg/100g). Seaweed has low lipid content ($2.83\pm 0.05\%$) and a high amount of carbohydrates.

Since the nutritional composition may vary depending on the drying method, this study also assessed the effect of different methods of drying (drying in the shade, by lyophilization, in the sun and in a drying oven) the variation in fatty acid profile. The results showed that despite the low lipid content, the algae samples showed a good profile in terms of contents in PUFA, n3 and n6 (yielded average values of 34.9%, 15.7% and 19.2%, respectively), important for a healthy diet. It was found that the greater contents of PUFA fatty acids were obtained in samples dried in drying oven (42%) and by the sun (37%); for the n3 fatty acids, the sun and lyophilization drying processes allowed best results ($\approx 21\%$); to n6 fatty acids, it was the oven drying process (31%); and, the drying treatments that favored ratio n6/n3 were the sun (0.8%) and lyophilization (0.4%) processes.

The study carried out by cyclic voltammetry also allowed to verify that the ethanol extract of *F. vesiculosus* algae, dried on the lyophilizer, was the most enriched in phenolic compounds (198 ± 12 mg equivalent of ascorbic acid per gram of dry sample). Nevertheless, this did not influence the antioxidant capacity of different extracts from seaweed, since the potential (0.61 ± 0.5 V) corresponding to the maximum intensity of the anodic peak was similar in all drying processes.

Keywords: *Fucus vesiculosus* seaweed; drying methods; composition of macronutrients; fatty acids profile; amount of phenolic compounds; Weende method; gas chromatography; cyclic voltammetry.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Macroalgas Marinhas	1
1.2	Fucus vesiculosus	3
1.3	Macroalgas como alimento	4
1.4	Composição Nutricional das macroalgas	5
1.4.1	Proteínas e aminoácidos	7
1.4.2	Hidratos de Carbono	9
1.4.4	Fibra dietética	9
1.4.5	Lípidos	10
1.4.6	Minerais	12
1.4.7	Antioxidantes	14
1.5	Alteração no processo de secagem/ armazenamento	17
2	Material e Métodos	19
2.1	Recolha e preparação das amostras	19
2.2	Avaliação da Composição Nutricional	19
2.2.1	Determinação do teor de humidade	20
2.2.2	Determinação do conteúdo em cinzas	20
2.2.3	Determinação do conteúdo em gordura	21
2.2.4	Determinação do conteúdo em fibra bruta	21
2.2.5	Determinação do conteúdo em proteína bruta	22
2.2.6	Determinação do conteúdo em hidratos de carbono	22
2.2.7	Determinação do conteúdo em minerais	23
2.2.8	Determinação quantidade de fósforo	23
2.3	Avaliação da composição química dos processos de secagem	24
2.3.1	Determinação do perfil em ácidos gordos	24
3	Resultados e Discussão	32

3.1 Caraterização da composição nutricional	32
3.1.1 Macronutrientes	32
3.1.2 Minerais	36
3.2 Caraterização do perfil em ácidos gordos	39
3.3 Voltametria Cíclica	47
4 Considerações Finais	54
Referências Bibliográficas	55
Anexo I – Mistura de padrões utilizada para identificação dos ácidos gordos.....	xiv
Anexo II - Dose de ingestão de referência recomendadas para minerais.....	xv

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Macroalgas edíveis para fins alimentares	5
Tabela 1.2 - Composição nutricional de algas selecionadas (%peso seco)	7
Tabela 1.3 - Diferentes tipos de fibras que é possível encontrar nas algas marinhas	10
Tabela 3.1 - Caracterização da composição nutricional <i>Fucus vesiculosus</i> .	33
Tabela 3.2 - Valores nutricionais de vários alimentos (em cru) retirado da Tabela de Composição de Alimentos para comparação dos obtidos para a alga <i>Fucus vesiculosus</i>	35
Tabela 3.3- Composição em macronutrientes da alga <i>Fucus vesiculosus</i> recolhida na praia da Barra (Aveiro) e comparação dos valores com os de vários alimentos (em cru) da Tabela de Composição de Alimentos	36
Tabela 3.4 - Perfil de ácido gordos presentes nas amostras <i>Fucus vesiculosus</i> que sofreram diferentes tipos de secagem, bem como, os valores mínimos e máximos, das médias e dos desvios padrão.	40
Tabela 3.5 - Matriz de correlações para as 26 variáveis associadas ao perfil de ácidos gordos	43
Tabela 3.6 - Estudo estatístico de comparação entre os resultados obtidos para as amostras de <i>Fucus vesiculosus</i> que sofreram diferentes tipos de secagem (grupos)	44
Tabela 3.7 - Padrão de diferenças entre amostras obtidas pelos testes Post-hoc	45

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação da alga <i>F. Vesiculosus</i>	4
Figura 1.2 – Composição nutricional das macroalgas edíveis	6
Figura 1.3 – Estruturas Químicas dos florotaninos: floroglucinol, eckol, florofucofuroeckol-A e dieckol	16
Figura 1.4 - Estrutura química da fucoxantina	17
Figura 2.1 - A) Chip da Micrux com três eléctrodos de platina; B) Aplicação de 15 µL da solução teste para a análise por voltamétrica	28
Figura 2.2 - Voltamograma cíclico	29
Figura 3.1 – Gráfico de barras comparando as concentrações de minerais obtidos em algas neste estudo com os do trabalho apresentado por Rupérez (2002)	38
Figura 3.2 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a solução redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ após repetições das lavagens	48
Figura 3.3 - Voltamogramas cíclicos para soluções com diferentes concentrações de ácido ascórbico	49
Figura 3.4 - Relação linear obtida na calibração com o ácido ascórbico usando as intensidades de corrente do pico anódico.	50
Figura 3.5 - Voltamogramas cíclicos obtidos para as 4 amostras secas de algas analisadas.	51
Figura 3.6 - Boxplot das concentrações em compostos fenólicos para cada grupo de amostras secas com diferentes tipos de tratamento.	52
Figura 3.7 - Intervalos de confiança a 95% das diferenças entre as médias de cada comparação.	52

Preâmbulo

1) Enquadramento

Nos últimos 50 anos houve um aumento da procura de algas para fins alimentares. Neste contexto, a importância do estudo prende-se com o fato das algas serem, um recurso marinho potencialmente renovável e com potenciais atividades biológicas. A macroalga *Fucus vesiculosus* foi seleccionada para este estudo, por se tratar de uma alga edível, facilmente encontrada na costa Portuguesa e que pode representar uma importante fonte de nutrientes e novos compostos bioativos para utilização na indústria alimentar e farmacêutica.

2) Objetivos

Um dos principais objetivos deste estudo foi o da avaliação da composição nutricional da alga *F. vesiculosus* recolhida na Praia da Barra (Aveiro). Adicionalmente, pretendeu-se perceber de que forma diferentes métodos de secagem (por estufa a 65°C, sol, sombra e liofilização) poderiam afetar o perfil em ácidos gordos e os conteúdos fenólicos (associados à capacidade antioxidante) de extratos etanólicos desta alga.

3) Estrutura do trabalho

O primeiro capítulo corresponde à Introdução, resultante de uma pesquisa bibliográfica, referindo-se o uso atual das macroalgas como alimento e a sua composição nutricional, bem como, as considerações sobre alterações nos compostos bioativos (ácidos gordos e antioxidantes) no processo de secagem/ armazenamento. É ainda apresentada a caracterização morfológica da *F. vesiculosus* e algumas das suas atuais aplicações.

No segundo capítulo, Material e Métodos, faz-se uma descrição da amostragem, preparação das amostras de algas e dos procedimentos analíticos usados na avaliação da composição nutricional da *F. vesiculosus*. Nesta secção são igualmente referidos os

procedimentos utilizados na determinação do perfil em ácidos gordos e na análise dos conteúdos em compostos fenólicos (que permite avaliar a capacidade antioxidante) de extratos de amostras da alga sujeita a diferentes métodos de secagem.

No terceiro capítulo, Resultados e Discussão, efetuou-se a apresentação, tratamento e discussão de dados experimentais sobre a avaliação da composição nutricional, caracterização do perfil em ácidos gordos e dos conteúdos fenólicos da *F. Vesiculosus*.

No último capítulo, Considerações Finais, apresentam-se as conclusões mais relevantes obtidas no estudo e o trabalho futuro para completar o estudo.

Por fim, apresentam-se as referências bibliográficas que foram consultadas para a execução deste trabalho.

Lista de Abreviaturas

% – percentagem

µL – microlitros

AAE – aminoácidos essenciais

AG – ácido gordo

C/min – Concentração por minuto

DCV's – doenças cardiovasculares

DHA – ácido docosahexaenóico

EPA – ácido eicosapentaenóico

FAO – Agricultura das Nações Unidas

g – grama

g/L – grama por litro

GC – cromatografia gasosa, do inglês gás chromatography

GDA's – guias de referência dietéticas, do inglês Dietary Guidelines

max – máximo

mg – miligrama

mg/ 100 g – miligrama por cem gramas

mg/kg – miligrama por quilograma

min – mínimo

mL – mililitro

MUFA – ácido gordo monoinsaturado, do inglês monoinsaturated fatty acids

nm – nanómetro

°C – graus celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

ppm – parte por milhão

PUFA – ácido gordo polinsaturado (do inglês, polyunsaturated fatty acid)

ROS – espécies reativas de oxigênio

s – segundo

SFA – Ácido gordo saturado (do inglês, saturated fatty acid)

UNU – Universidade das Nações Unidas

UV – ultra- violeta

V – volts

α -amilase – alfa - amilase

α -glucosidase – alfa- glicosidase

ω 3 – ácidos gordo ómega 3

ω 6 – ácido gordo ómega 6

1 Introdução

Nesta secção faz-se uma breve descrição sobre as macroalgas marinhas e a sua composição nutricional.

1.1 Macroalgas Marinhas

As macroalgas marinhas são atualmente classificadas como seres aquáticos e fotossintéticos, com diferentes colorações, sendo que, esta última característica dependente da combinação de diferentes pigmentos presentes nas suas células. Na prática, a composição de pigmentos é utilizada para definir os filos e classes a que pertencem as macroalgas. As macroalgas são classificadas como pertencentes ao Domínio Eukarya e aos Reinos Plantae (algas verdes e vermelhas) e Chromista (algas castanhas). Atualmente considera-se que as algas estão divididas em 3 filos (Pereira, 2012; Pereira, 2008; Pereira et al., 2013):

- Filo Chlorophyta: macroalgas verdes, que possuem pigmentação idêntica às plantas terrestres (clorofilas a, b e carotenóides);
- Filo Rhodophyta: macroalgas vermelhas, que possuem pigmentos fotossintéticos (clorofila a, ficobilinas e carotenóides);
- Filo Heterokontophyta: macroalgas castanhas, que possuem como pigmentos as clorofilas a, c e carotenóides, com predominância da fucoxantina.

As macroalgas são a base da cadeia alimentar de todos os ecossistemas aquáticos, atuando como produtoras primárias de oxigénio e compostos orgânicos, utilizando para tal a luz solar, dióxido de carbono e substâncias inorgânicas presentes na água no momento da fotossíntese. Servem de alimento base aos outros seres vivos e podem ser um importante recurso para o homem (Pereira, 2008).

As algas marinhas habitam os oceanos há mais de 2 mil milhões de anos, sendo utilizadas como alimento pelos povos na Ásia Oriental desde o século XVII, especialmente no Japão, China e Coreia. Nas comunidades costeiras, as algas são usadas desde há muito para produção de medicamentos caseiros para tratamento de múltiplas doenças. Atualmente, o maior cultivo de macroalgas marinhas ocorre no

continente asiático, mas a sua exploração verifica-se em vários países (Reino Unido, Irlanda, Austrália, Estados Unidos, etc) para fins diversos, tais como, o consumo humano (como fonte de alimento direto ou aditivos na produção alimentar), extração de ficocolóides e de compostos com ação antiviral e antibacteriana para a indústria farmacêutica, e para produção de cosméticos. Uma das algas mais exploradas em Portugal é o *Sargassum muticum*, vulgarmente chamado de “Sargaço”, produzido na costa litoral vianense, e que é extraído para produção de biofertilizantes (Pereira, 2008; Leonel, 2010).

As costas ibéricas estão sob circunstâncias únicas, recebendo influências climáticas do Atlântico Norte (oeste, costa norte e ilhas adjacentes) e do Mar Mediterrâneo, (costas orientais do sul e ilhas adjacentes), gerando um gradiente latitudinal na flora de macroalgas. Ao longo da costa, zonas rochosas estão separadas por áreas extensas de praias de areia. A maioria das praias das costas ocidentais estão muito expostas e as algas que aparecem são encontradas mais próximas do nível da maré baixa. A flora de algas da zona norte é semelhante ao da costa da Europa Central (ou seja, Bretanha, França e partes do sul das Ilhas Britânicas), enquanto que, a flora de algas na costa do sudoeste e do leste é muito diferente, respondendo a uma influência marcante do Mediterrâneo e das espécies do noroeste da costa Africana (Cardoso et al., 2014; Sousa-Pinto, 2006; Pereira, 2015).

A flora das zonas do noroeste está dominada pelas algas *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Himanthalia elongata*, *Saccorhiza polyschides* (Phaeophyceae, Fucales), *Gelidium córneo*, *Gelidium pulchellum* (Rhodophyta, Gelidiales), *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *Calliblepharis jubata*, *Gigartina pistillata*, *Chondracanthus acicularis* (Rhodophyta, Gigartinales), *Osmundea pinnatifida*, *Pterosiphonia complanata* (Rhodophyta, Ceramiales) e *Corallina elongata* (Rhodophyta, Corallinales). As zonas do sudoeste são dominadas pelas algas: *Corallina elongata* (Rhodophyta, Corallinales), *Caulacanthus ustulatus*, *Chondracanthus acicularis* (Rhodophyta, Gigartinales), *Gelidium pusillum*, *Osmundea pinnatifida* e *Chondria coerulescens* (Rhodophyta, Ceramiales) e *Codium adherens* (Chlorophyta, Bryopsidales) (Cardoso et al., 2014; Pereira 2015; Sousa-Pinto, 2006).

Portugal apresenta uma extensão de mar acima dos 2000 km, o que faz com que seja um país privilegiado face a outros países europeus no que se refere ao acesso e disponibilidade dos recursos naturais que o mar nos oferece (Pereira, 2015). Com uma faixa costeira de 830 quilómetros, o litoral português evidencia-se pela riqueza da sua flora, em grande parte resultante da diversidade das influências climáticas decorrentes da sua situação biogeográfica peculiar (Pereira, 2008; Pereira e van de Velde, 2011).

As algas são responsáveis por uma proporção significativa da produção primária da Península Ibérica. A coleção tradicional de algas e respetivas utilizações foram descritas, pela primeira vez, no século XIV. A colheita de algas, que ainda é feita no norte do Portugal, foi regulamentada pela primeira vez em 1308 pelo rei D. Dinis e esse uso foi constante até o século XX (Cardoso et al., 2014; Sousa-Pinto, 2006).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a falta de Agar produzido pelos japoneses, permitiu a emergência de uma indústria agar Português, devido à abundância e qualidade de algas vermelhas locais (principalmente *Gelidium córneo* e *Pterocladia capillacea*) (Pereira, 2015). No entanto, o perfil económico internacional desfavorável criou condições que levaram à redução acentuada desta indústria. Atualmente, apenas uma empresa continua a persistir (Iberagar - Sociedade Luso -Espanhol de marinha Colloids, SA) (Cardoso et al. 2014; Leonel, 2010). Iberagar, é uma empresa de liderança Portuguesa, que atua no fabrico e distribuição de hidrocolóides extraídos das algas (Cardoso et al., 2014). A par disso, recentemente, algumas empresas (Algaplus, Wedotech, Algafuel, entre outros) iniciaram atividades, a fim de aproveitar o potencial biotecnológico da flora marinha da península ibérica (Cardoso et al., 2014).

1.2 Fucus vesiculosus

F. vesiculosus é uma alga marinha castanha, com cor variável entre o verde azeitona e verde acastanhado e o castanho avermelhado (Figura 1.1). Tipicamente, tem cerca de 40 centímetros de comprimento (podendo atingir 1,5 a 2 metros). Esta alga é vulgarmente conhecida por bodelha e é caracterizada por possuir pequenas vesículas esféricas cheias de ar (bexigas), que são responsáveis por manter as algas flutuantes na posição vertical nas fixações rochosas, o que permite aumentar a sua capacidade de fotossíntese. Cresce numa ampla variedade de áreas costeiras expostas nas lagoas

salinas e é encontrada facilmente em praias abrigadas do litoral. Em Portugal esta alga é encontrada no litoral norte (Pereira, 2015; Seaweed Industry Association, 2015).



Figura 1.1 - Representação da alga *F. Vesiculosus*
(fonte: http://macoi.ci.uc.pt/spec_detail.php?cult_id=4096)

A utilização de *F. vesiculosus* ao nível da nutrição é comum, encontrando-se na forma de suplementos alimentares, alimentação animal, suplementos de iodo (fonte original de iodo permite a regulação da função tiroideia), produtos de emagrecimento e também como aditivo alimentar e aromatizante em vários alimentos comercializados na Europa (Rupérez et al., 2002; Kumar e Brown, 2013).

1.3 Macroalgas como alimento

Como anteriormente referido, as algas marinhas são usadas desde há séculos como alimento pelos povos na Ásia Oriental (Pereira, 2012). Globalmente são conhecidas mais de 145 espécies edíveis, no entanto, a legislação europeia (EC258/97) restringiu a utilização de macroalgas na alimentação (humana e animal) para apenas 22 espécies (Tabela 1.1). De notar que, esta classificação foi baseada em registos de consumo por

parte dos povos europeus e não por questões de segurança alimentar. Entre o ano de 2004 e 2008, surgiram a nível mundial 2800 novos produtos à base algas ou com algas na sua constituição. Maioritariamente, estes produtos surgem na Ásia (85%) contra os 5% que surgiram na Europa (CyberColloids, 2015).

Tabela 1.1 – Macroalgas edíveis para fins alimentares (Fonte: Seaweed Industry Association)

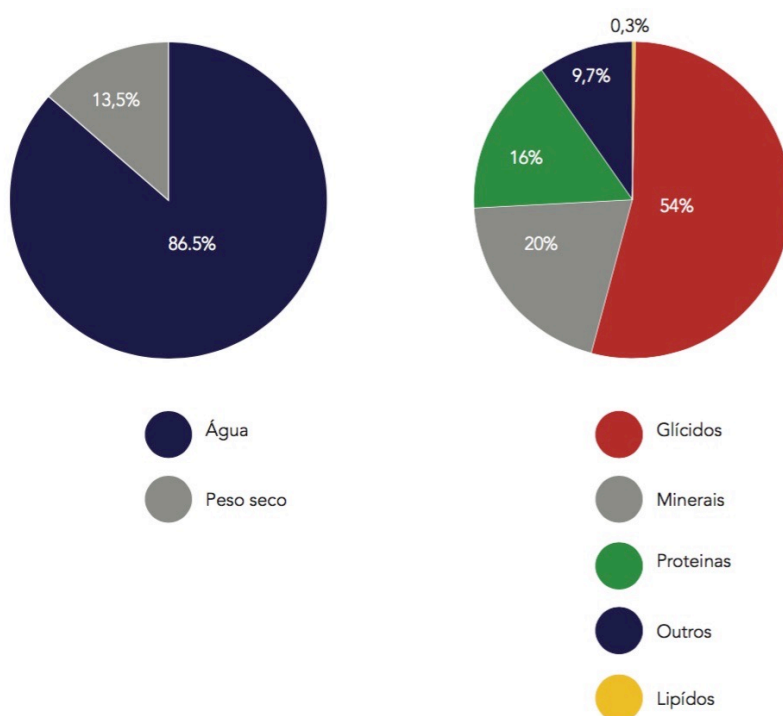
NOME CIENTÍFICO	NOMES COMUNS
ALGAS CASTANHAS	
<i>Ascophylum nodosum</i>	Rockweed, Egg wrack, Bladderwrack
<i>Fucus</i> spp.	<i>F. spiralis</i> (Bodelha, Botelho, Fava do Mar, Spiral wrack); <i>F. vesiculosus</i> (Bladder wrack)
<i>Himanthalia elongata</i>	Esparguete do Mar, Sea spaghetti,
<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakame, kelp
<i>Laminaria digitata</i>	Kombu, kelp
<i>Laminaria japonica/ Saccharina japónica</i>	Sea tangle, Kombu, Japanese kelp
<i>Saccharina latissima</i>	Sugar kelp, Royal kombu
<i>Alaria esculenta</i>	Wakame atlântico, Wing kelp, Dabberlocks
ALGAS VERMELHAS	
<i>Palmaria palmata</i>	Botelho comprido, Dulse, Dilisk
<i>Porphyra</i> spp. (<i>umbilicalis</i> , <i>tenera</i> , <i>yezoensis</i> , <i>dioica</i> , <i>purpurea</i> , <i>laciniata</i> , <i>leucosticta</i>)	Erva-patinha, Nori, Laver
<i>Chondrus crispus</i>	Musgo irlandês, Lichen, Irish moss
<i>Mastocarpus stellatus</i>	False Irish moss
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ogonori, Wart weed
<i>Lithothamnium calcareum</i>	Maerl
ALGAS VERDES	
<i>Ulva</i> spp.	Alface do mar; Sea-lettuce
<i>Enteromorpha</i> (now <i>Ulva</i>)	Erva-patinha verde; Gut laver; Aonori

1.4 Composição Nutricional das macroalgas

A aquisição de uma boa saúde física e mental obtida através da nutrição é a chave para o bem-estar dos seres humanos. Os nutrientes obtidos através da alimentação, ou sintetizados pelo organismo, desempenham um papel fundamental na regulação das funções corporais e são essenciais para o normal crescimento e desenvolvimento humano. Os macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas e lípidos) e micronutrientes (vitaminas e minerais) são fornecidos por fontes alimentares, de origem animal ou vegetal (maioria das plantas terrestres) (Kim SE-kwon, 2011).

As algas edíveis, em comparação com muitos vegetais que fazem parte da alimentação diária, são, na generalidade, ricas em hidratos de carbono (com níveis

elevados de fibras), proteínas (com aminoácidos essenciais disponíveis), minerais (20%) e com concentrações baixas de lípidos (0,3%) mas, com índices elevados de ácidos gordos polinsaturados) (Figura 1.2). Todas estas características tornam as algas numa importante fonte de alimento para a nutrição humana. No entanto, as quantidades disponíveis de nutrientes podem variar dependendo da variedade, sazonalidade ou área de produção geográfica (Bocanegra et al., 2009; Ortiz et al., 2006, Murata e Nakazoe, 2001).



Fonte: Pereira, L. (2010). Algas os seus usos na agricultura, industria e alimentação. Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra

Figura 1.2 - Composição nutricional das macroalgas edíveis

Na tabela seguinte (Tabela 1.2), encontram-se resumidas as quantidades de nutrientes (proteína, fibra, glicídios e lípidos) de algumas algas (castanhas, verdes e vermelhas).

Como se pode verificar pela análise da Tabela 1.2, no geral, as algas possuem uma composição semelhante em macronutrientes. As algas vermelhas destacam-se por serem mais ricas em proteína, seguidas das algas verdes e das algas castanhas. Por

outro lado, as algas castanhas são as mais ricas em glúcidos. Ainda é possível verificar que todas as espécies possuem um teor baixo em lípidos, a variar entre 0,3% a 3,0% de peso seco.

Tabela 1.2 - Composição nutricional de algas selecionadas (Fonte: Pereira, L., 2012)

Espécie	Água, %	Proteína, % peso seco	Glúcidos, % peso seco	Fibra dietética, % peso seco	Lípidos, % peso seco
Algas verdes					
<i>Caulerpa lentillifera</i>	24 – 37	10 – 13	38 - 59	33	0,9 – 1
<i>C.racemosa</i>	7 – 19	18	33 - 41	65	10
<i>Ulva compressa</i>	17 – 19	21 – 32	48	29 – 45	0,3 – 4
<i>Ulva lactuca</i>	13	10 – 25	36 - 43	29 – 55	0,6 – 2
Algas Castanhas					
<i>Fucus spiralis</i>	-	11	-	64	-
<i>Fucus vesiculosus</i>	14 – 30	3 -14	47	45 – 59	2
<i>Himanthalia elongata</i>	27 – 36	5 – 15	44 - 61	33 – 37	0,5 – 1
<i>Laminaria digata</i>	38	8 – 15	48	36 – 37	1
<i>Sargassum fusiforme</i>	19,77	11,6	30,6	17 – 69	1,4
Algas Vermelhas					
<i>Chondrus crispus</i>	21	11 – 21	55 - 68	10 – 34	1,0 - 3,0
<i>Garcilaria changii</i>	22,7	6,9	-	24,7	3,3
<i>Palmaria palmata</i>	12 – 37	8 – 35	46 - 56	29 – 46	0,7 – 3
<i>Poplyra tenera</i>	8 – 21	28 – 47	44,3	12 – 35	0,7 - 1,3

1.4.1 Proteínas e aminoácidos

A proteína é um fator importante quando se avaliam os potenciais benefícios de um produto alimentar para a saúde, uma vez que é o nutriente essencial para o crescimento. Não somente a quantidade de proteína, mas também a qualidade da proteína é importante numa dieta saudável. A qualidade da proteína de um produto alimentar, é muitas vezes avaliada pelo seu conteúdo e composição em aminoácidos essenciais (AAE) (Maehre et al., 2014; FAO, 2013).

Tal como anteriormente referido, no geral as macroalgas são particularmente ricas em proteínas (contêm todos os aminoácidos essenciais), com cerca de 10-30% de peso seco nas algas vermelhas e verdes. Esta quantidade de proteína é comparável com a quantidade de proteína encontrada na soja (Burtin, 2003; Mišurcová et al., 2014). Nas algas castanhas o teor de proteína é mais baixo, em média, 3-15% de peso seco (Tabela 1.2).

O conteúdo em proteína varia com área geográfica, estação do ano, temperatura e o teor de nutriente disponível na água e além disso pela fase do ciclo de vida (Fleurence, 1999a; Mabeau, 1993).

Note-se que os aminoácidos representam papéis importantes no organismo tais como a construção de novos tecidos e a regulação e proteção do sistema nervoso (ácido aspártico e glicina). A fenilalanina atua na tiroide e os aminoácidos isoleucina e lisina participam na função do sistema imunológico, enquanto que, o triptofano possui um papel importante na produção de serotonina (Kim SE-kwon, 2011). É por isso de extrema importância o consumo regular de alimentos que proporcionem a quantidade diária adequada de proteínas necessárias ao organismo Humano. É no entanto importante que esta quantidade não exceda as 50 gramas diárias (Institute of Medicine, 2005).

Os índices de AAE encontrados nas algas vermelhas, são comparáveis aos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) para a dose diária. Assim, as algas vermelhas podem ser consideradas como uma boa fonte alimentar de proteína, de origem vegetal para ser incluída na dieta (Kim, 2011). Adicionalmente deve realçar-se que, algumas algas possuem um conteúdo de aminoácidos essenciais mais elevado do que o encontrado nas leguminosas (exceto para lisina, cistina e metionina) (Jeevitha et al., 2013; Kim et al., 2008).

Na realidade, a fração livre de aminoácidos nas algas é constituída principalmente por alanina, ácido aminobutírico, taurina, ornitina, hidroxiprolina e citrulina, embora em diferentes proporções, de acordo com a espécie. Salienta-se, por exemplo, o facto de que o sabor característico da alga Nori é provocado por grandes quantidades de três aminoácidos: alanina, ácido glutâmico e glicina (McHugh, 2003).

A OMS, FAO e a Universidade das Nações Unidas (UNU) têm focado a sua atenção nas necessidades nutricionais da população mundial e, como tal, elaboraram recomendações sobre as exigências nutricionais fundamentais, incluindo a de

aminoácidos. A contribuição para a potencial inclusão de algumas algas numa dieta saudável foi fornecida por MacArtain et al. (2007), com vista à inclusão de minerais, vitaminas e proteína, bem como as respetivas doses de referência diárias destes nutrientes (MacArtain et al., 2007). O fornecimento de alimentos e/ou suplementos ricos em aminoácidos essenciais, provenientes de algas, tem especial interesse em países do 3º mundo, onde a carência de proteína se reflete. Por outro lado, o estilo de vida moderno de muitos países do mundo tem resultado numa modificação dos padrões alimentares e no aumento do número de pessoas que aderiram a dietas vegetarianas e vegans, com a consequente procura de alimentos que possam satisfazer as suas necessidades de proteína diárias (Mišurcová et al., 2014).

1.4.2 Hidratos de Carbono

As algas contêm uma grande quantidade de hidratos de carbono que pode variar de 20 a 76% do seu peso seco, dependendo da espécie (Holdt e Kraan, 2011). Embora o teor de hidratos de carbono em algas seja consideravelmente elevado, a sua maior parte está disponível sob a forma de polissacarídeos sulfatados, os quais não são absorvidos pelo sistema digestivo humano. O teor de fibra disponível das algas varia entre os 25 e 75% de peso seco, dos quais 51 a 81% é fibra solúvel (i.e. mucilagens, que quando ingerida é responsável pela sensação de saciedade) e o restante de fibra insolúvel (que ajuda no bom funcionamento da trânsito intestinal) (Kim, 2011). Por outro lado, as formas absorvíveis de hidratos de carbono presentes nas algas compreendem glucose, manose e galactose mas, que se apresentam em percentagens baixas (12,3%) (Hahn et al., 2012; Kim et al., 2014).

1.4.4 Fibra dietética

Tal como acontece com a fibra de fontes alimentares vegetais, a fibra de algas tem despertado interesse, uma vez que o seu consumo tem sido associado a uma redução significativa de doenças crónicas, tais como diabetes mellitus tipo 2, obesidade, hipertensão arterial, entre outras (Gómez-Ordóñez et al., 2010; Jeevitha et al., 2013). Na realidade, a fibra solúvel pode retardar a digestão e absorção de nutrientes,

aumentando a viscosidade e desta forma, contribuir para a regulação da circulação de açúcar no sangue e colesterol (Mabeau, 1993). Ainda, a sua capacidade na inibição de enzimas como a α -amilase e a α -glucosidase (que são responsáveis pela degradação do amido na dieta em glucose) tem sido estudada como um método para controlar os níveis de açúcar no sangue (Cardoso et al., 2014; Kim et al., 2014). É ainda importante salientar que apesar de não ser digerida no trato superior do sistema digestivo, a fibra dietética pode ser degradada pelas bactérias do cólon, o que vai contribuir a regulação da microflora intestinal (Lahaye, 1998) . Na Tabela 1.3 estão apresentadas os tipos de fibras característicos de cada espécie de algas. Dentro das fibras presentes nas algas e com interesse de estudo, encontram-se as fucoïdanas, apenas encontradas nas algas castanhas. As fucoïdanas são compostos bioactivos, abundantes em algas como a *F. vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum* (Kim, 2011). Entre os efeitos atribuídos a este tipo de fibra estão as actividades anti-coagulantes, anti-HIV e anti-tumorais (Li et al., 2011; Gupta e Abu-ghannam, 2011).

Tabela 1.3 – Diferentes fibras que é possível encontrar nas algas marinhas

(Fonte: Kim, 2011)

Fibra solúvel (hidrocoloide)	Fonte
Agar	Algas Vermelhas
Carreganinas	Algas Vermelhas
Alginatos	Algas Castanhas
Fucoïdanas	Algas Castanhas
Laminarinas	Algas Castanhas
Ulvanas	Algas Verdes

1.4.5 Lípidos

A sociedade atual está confrontada com vários tipos de doenças de carácter epidemiológico, tais como, hiperlipidemia, colesterol elevado, diabetes mellitus tipo

2, aterosclerose, entre outras. Estas patologias estão diretamente relacionadas com o estilo de vida e alimentação pois, cada vez mais se opta por alimentos pré-cozinhados ricos em gorduras saturadas. Uma forma de contrariar este tipo de patologias é através de uma dieta rica em ácidos gordos insaturados (Tabarsa et al, 2012).

Uma vez que não são sintetizados pelo organismo Humano, os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) necessitam de ser obtidos através da dieta alimentar. Estes ácidos gordos assumem hoje em dia um papel fundamental devido aos seus efeitos biológicos demonstrados (Kathleen L., 2008).

Pelo exposto, existe atualmente uma maior procura pelos consumidores de produtos alimentares ricos em ácidos gordos polinsaturados e, em consequência disso, a indústria alimentar tem procurado novas fontes e processos alternativos para a sua produção (Tabarsa, 2012).

Quando comparadas duas famílias de ácidos gordos polinsaturados que fazem parte da dieta humana (ácidos gordos $\omega 6$ e ácidos gordos $\omega 3$), os ácidos $\omega 3$ são de particular interesse para a área emergente do desenvolvimento funcional de alimentos. Verifica-se que os ácidos gordos $\omega 3$ (ácido eicosapentaenóico, EPA, e o ácido docosahexaenóico, DHA) estão correlacionados com uma gama de funções, quer bioquímicas ou fisiológicas, importantes no organismo Humano. Por exemplo, possuem um efeito como agentes imunossupressores, anti-inflamatórios e imunomoduladores. O EPA é o ácido gordo que, geralmente, está presente em todas as algas (Simopoulos, 2002).

A relação $\omega 6/\omega 3$ ingerida na dieta é considerada importante na avaliação de uma dieta para um estilo de vida saudável. A OMS recomenda que esta razão não deve exceder que 10:1 na dieta humana e que, o ideal seria uma razão entre 2 a 5:1. No entanto, a generalidade da população tem um consumo a variar entre 15 a 17:1. A ingestão de níveis adequados destes ácidos gordos tem um importante papel na prevenção e modulação de várias doenças, comuns nas civilizações ocidentais, tais como as doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes e artrite reumatóide (Simopoulos, 2002). Uma alternativa que parece ser interessante na exploração de novas fontes destes ácidos gordos são as algas marinhas. Além de serem uma fonte primária de PUFAs, os ácidos gordos extraídos a partir das algas não têm odor desagradável, ao contrário do verificado nos óleos de peixe (Tabarsa, 2012).

Note-se que geralmente, as algas têm um baixo teor de gordura em comparação com os óleos de sementes, mas apresentam índices elevados PUFAs, que podem ser comparáveis com os encontrados nas plantas terrestres (Darcy-Vrillon, 1993).

Tal como outros nutrientes presentes nas algas, as concentrações de ácidos gordos também variam de acordo com a temperatura, ambiente e estação do ano, sabendo-se que as temperaturas mais baixas favorecem a sua produção (Tabarsa, 2012). No entanto, de forma geral, muitas macroalgas possuem índices elevados de cadeias de ácidos gordos C12-C22 (Kumari et al., 2010). As algas castanhas, nomeadamente as *Laminaria* sp., *Undaria* sp. e *Hizikia* sp. possuem elevados níveis de ácido oleico (C18:1n9), ácido alfa-linolénico (C18:3n3) e EPA (C20:5n3). Note-se que este último foi demonstrado como tendo um efeito positivo em atenuar os fatores de risco associados ao desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares (DCVs) (Kumari et al., 2010).

Numa pesquisa efetuada por Mehdi Tabarsa em algas castanhas, verificou-se que a relação $\omega 6/\omega 3$ encontrada era no máximo 0,71, sugerindo assim que as algas castanhas poderiam contribuir para a redução da razão $\omega 6/\omega 3$ na alimentação (Kathleen L. 2008; Tabarsa, 2012).

1.4.6 Minerais

As algas são conhecidas por possuírem uma grande variedade e níveis elevados de certos sais minerais (podem variar de 8-40% do peso seco da alga). São consideradas boas fontes de oligoelementos (por exemplo, cálcio, ferro, iodo e sódio) e, por isso, são também usadas como aditivos de sais minerais na indústria alimentar (Rupérez, 2002). O alto conteúdo de sais minerais está diretamente relacionado com a sua capacidade de reter substâncias inorgânicas marinhas devido à troca iónica entre a superfície celular da alga e o meio (Fleury, 1991). A composição mineral de macroalgas varia consoante o filo, ou mesmo a espécie (Hou, 1998), bem como, com outros factores, tais como as variações ambientais e fisiológicas, origem geográfica, sazonalidade e exposição às ondas (Bocanegra et al., 2009). Geralmente, as macroalgas marinhas possuem níveis elevados de sais minerais: sódio (Na), magnésio (Mg), potássio (K), fósforo (P), iodo (I), ferro (Fe) e zinco (Zn) (Bocanegra et al., 2009). De referir que, as algas contêm grandes quantidades de oligoelementos

(Rupérez, 2002) que normalmente são escassos nos vegetais e, portanto, são produtos interessantes para a criação de suplementos capazes de responder às necessidades diárias de um indivíduo (Cardoso et al., 2014).

Note-se que embora a maioria das algas apresente valores mais elevados de sódio e potássio do que os descritos em vegetais terrestres, a relação de sódio/potássio (Na/K) é geralmente baixa (MacArtain et al., 2007). A razão Na/K é sem dúvida uma das grandes vantagens das algas como alimento pois, é ideal para contrabalançar as dietas ocidentais modernas ricas em sódio com baixos teores de potássio que, como se sabe são uma grande causa de hipertensão e complicações cardiovasculares associadas (MacArtain et al., 2007).

Os teores de cálcio e fósforo de certas algas são mais elevados do que aqueles encontrados em maçãs, laranjas, cenouras e batatas (Hou, 1998). A elevada relação Ca/P em algas (3:5), necessária para a absorção de Ca pelo organismo, pode compensar o défice de Ca em vários alimentos, como cereais e carnes (Hou, 1998).

Em relação ao iodo, deve referir-se que as algas são uma fonte original deste mineral, com valores gerais entre 1500 a 8000 ppm de peso seco (Teas, 2004). Em 1811 foi descoberto que, devido ao elevado conteúdo em iodo, a alga *F. vesiculosus* poderia ser utilizada para o tratamento de bócio (inchaço na glândula tiróide relacionado à deficiência de iodo). Esta alga funciona também, como um estimulante de tiróide que é utilizado para combater a obesidade (eleva a taxa metabólica. O iodo pode atingir níveis elevados em certas algas castanhas, enquanto que as algas verdes apresentam valores baixos ou inexistentes (Cardoso et al., 2014). No entanto, é importante advertir que devido ao alto conteúdo de iodo, as algas não devem ser consumidas no caso de existirem disfunções tiróideias (hipertiróidismo), uma vez que pode agravar o estado patológico, tornando-se perigoso o seu consumo (Rupérez, 2002).

Apesar da sua riqueza em minerais, a qualidade da alga deve ser sempre avaliada ao nível dos metais pesados (por exemplo, arsénio, cádmio, cobre, mercúrio e chumbo), já que estes constituem um potencial risco para a saúde Humana. Note-se que, as concentrações destes metais podem atingir níveis elevados em algas colhidas em ambientes aquáticos poluídos (Cardoso et al., 2014).

1.4.7 Antioxidantes

Os antioxidantes naturais obtidos de algas são o tipo de compostos que tem despertado grande interesse, podendo por exemplo vir a substituir os antioxidantes sintéticos, para prolongar o tempo de vida útil em prateleira de alimentos e cosméticos. Por exemplo, nos cosméticos, os antioxidantes naturais podem conferir propriedades valiosas para o produto, agindo contra as doenças associadas à oxidação, tais como o envelhecimento da pele provocado pelos danos da exposição aos raios ultra-violeta (Ngo et al., 2011).

Nos últimos anos, as algas castanhas têm despertado grande interesse por conterem teores comparativamente mais elevados de antioxidantes e compostos bioativos, (florotaninos e o carotenóide fucoxantina), do que os encontrados nas algas verdes e vermelhas (Fung et al., 2013; Jiménez-Escrig et al., 2001). De facto, as macroalgas são frequentemente expostas a uma combinação de fortes concentrações de luz e de oxigénio que provocam a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e outros agentes oxidantes fortes. A fim de sobreviver no ambiente marinho, as algas desenvolveram sistemas de defesa protetores químicos através dos antioxidantes. Estes mecanismos consistem numa matriz de compostos antioxidantes que podem ou não trabalhar de forma sinérgica para limitar a oxidação (Burtin, 2003; Zaragoza et al., 2008).

Neste âmbito, destacam-se de forma resumida os compostos antioxidantes mais comuns, presentes em algas castanhas, como o caso de algumas vitaminas, florotaninos e a fucoxantina.

1.4.7.1 Vitaminas

As vitaminas possuem não só consideráveis funções para o bom funcionamento do organismo, mas também outras qualidades importantes, tais como a atividade antioxidante. Por exemplo, a vitamina C (com função antioxidante) foi demonstrada ser útil na redução do risco de cancro do estômago (Kim, 2011), enquanto a vitamina E tem uma influência positiva sobre a mortalidade por doenças cerebrovasculares.

Estudos também demonstram uma boa correlação entre uma dieta rica em betacaroteno e a diminuição de doenças cardiovasculares e cancro do pulmão (Kim, 2011).

Certos grupos de pessoas (indivíduos com necessidades de dieta especial, fumadores, etc) são propensas a algumas deficiências de vitaminas e, portanto, a inclusão de alimentos funcionais na dieta pode ajudar na colmatação deste problema. A razão do aparecimento de hipovitaminoses pode ser causada não só pela ingestão insuficiente de alimentos, mas também pelo aumento da exigência nutricional pelo metabolismo, má absorção e utilização inadequada dos nutrientes (Mahan & Escott-Stump, 2000).

Geralmente, as algas contêm um teor equivalente de vitaminas hidrossolúveis (complexo B e vitamina C) e vitaminas lipossolúveis (provitamina A e vitamina E) (Pereira 2008), embora algumas delas possuam índices vitamínicos relativamente baixos (Kim SE-kwon 2011). Deve realçar-se que as algas vermelhas *Porphyra* sp. (Nori) são referenciadas como uma boa fonte de vitaminas do complexo B.

1.4.7.2 Florotaninos

Florotaninos são compostos fenólicos exclusivos de algas castanhas. Estes compostos fenólicos acumulam-se principalmente no citoplasma da célula, em vesículas de secreção especializadas, que podem representar até 25% do peso seco da alga (Li et al., 2008).

Embora os estudos com foco na caracterização e bioatividade de florotaninos ainda sejam muito limitados, vários destes compostos já foram isolados e caracterizados (por exemplo, floroglucinol, ecol, diecol e florofucofuroecol A) (Figura 1.3). Estes compostos estão associados a uma ampla gama de actividades biológicas, incluindo um potencial antioxidante elevado (Holdt e Kraan, 2011), atividade antimicrobiana, efeito anti-diabético, hepatoprotetor e anti-inflamatório (Li et al, 2011). Os níveis de florotaninos variam muito entre os diferentes grupos taxonómicos e a origem geográfica. Variações podem ocorrer na mesma espécie devido a factores como o tamanho da planta, idade, tipo de tecido ou ainda devido a factores ambientais, tais como nutrientes, luz, salinidade, profundidade da água e sazonalidade (Cardoso et al. 2014).

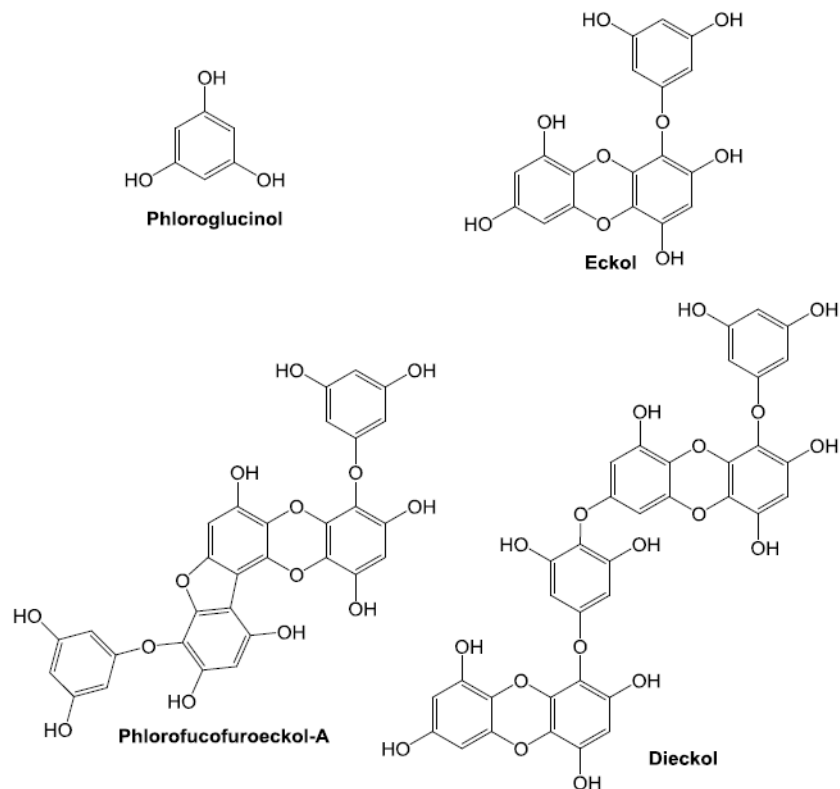


Figura 1.3 - Estruturas Químicas dos florotaninos: floroglucinol, ecol, florofucofuroeckol-A e diecol (Fonte: Cardoso et al, 2014).

1.4.7.3 Fucoxantina

O carotenóide dominante nas algas marinhas castanhas é a fucoxantina (Figura 1.4). Este carotenóide recentemente atraiu muita atenção devido às suas fortes propriedades antioxidantes (Miyashita e Hosokawa, 2008). Para além desta atividade, vários estudos revelam que este pigmento possui efeito na prevenção de obesidade, anti-inflamatório, diabetes, hepatoprotetor e antitumoral (D’Orazio et al., 2012).

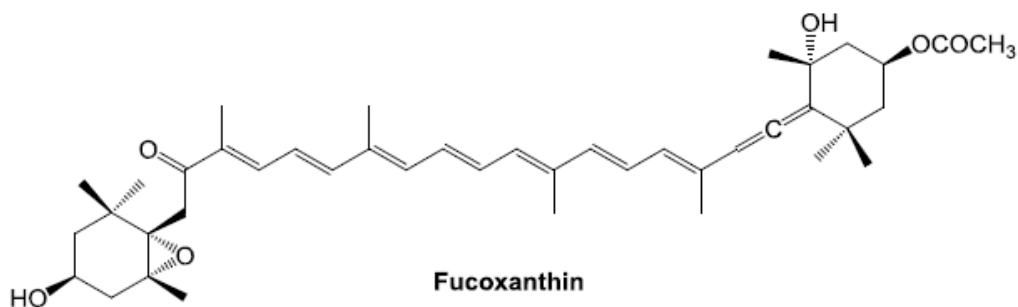


Figura 1.4 – Estrutura química da fucoxantina (Fonte: Cardoso et al, 2014)

Este carotenóide encontra-se em quantidade baixa nas algas secas e armazenadas à temperatura ambiente, indicando que o processo de secagem o pode decompor. Os níveis de fucoxantina também podem variar significativamente com a estação do ano e ciclo de vida da alga. Os níveis mais elevados ocorrem entre o inverno e primavera (fase madura de esporófito) e os mais baixos durante o verão (fase de senescência) (Terasaki et al., 2009).

1.5 Alteração no processo de secagem/ armazenamento

Usualmente as algas são “apanhadas” do mar e posteriormente são secas, ainda antes de sofrerem uma avaliação nutricional, ou processamento industrial. Para escolher o processo de secagem é essencial perceber o que se quer preservar e qual a finalidade comercial da alga, ou seja qual o método que melhor se adequa para a finalidade de uma alga específica (Le et al., 2008).

Sabe-se que o conteúdo em nutrientes, como o caso da vitamina C, pode ser afectado, quando os alimentos são submetidos a elevadas temperaturas no processo de secagem ou no processo de cocção (Chan et al., 1997; Mabeau, 1993).

Num estudo efectuado com o objectivo de avaliar a quantidade de nutrientes em vários processos de secagem, verificou-se que o método mais eficaz na preservação de valor nutricional era o processo de liofilização. No entanto, como este processo representa custos elevados nem sempre é a escolha por parte da indústria. Por outro

lado, as algas secas ao sol podem sofrer várias variações, estando a preservação das características nutricionais dependente das condições climáticas. Neste processo verifica-se que, por vezes, há diminuição de minerais e vitamina C (Jiménez-Escrig et al., 2001). De acordo com o estudado por Chan, a rápida secagem em estufa (65°C) (Chan et al., 1997) preserva minerais. Assim sendo, para escolher o melhor método de secagem há que ter em conta as condições económicas, ambiente e a alga em causa, uma vez que não são afetadas da mesma forma. No caso da alga *S. muticum*, dentro dos métodos testados (secagem por sol, estufa, liofilização e sombra), o que demonstrou ser o mais apropriado foi a liofilização (Chan et al., 1997). Apesar do valor nutritivo nas algas processadas não parecer ser afetado de forma significativa, desde que as algas sejam armazenadas em condições controladas, verificou-se que durante o processo de secagem e armazenamento existe diminuição do conteúdo de compostos bioativos (Jiménez-Escrig e Sánchez-Muniz, 2000), o que sugere que estes compostos são mais sensíveis do que os compostos nutricionais. Num estudo levado a cabo por Jiménez-Escrig, 2001, para avaliar o poder antioxidante em algas, a *F. vesiculosus*, foi das espécies que demonstrou ter um poder antioxidante elevado e apresentou uma correlação estatisticamente significativa entre o conteúdo em polifenóis e a atividade de remoção de radicais.

2 Material e Métodos

2.1 Recolha e preparação das amostras

A alga *F. vesiculosus* foi recolhida na Praia da Barra (Aveiro) em Setembro de 2013 e dividida em dois grupos de amostras. Para a preparação de todas as amostras, procedeu-se à sua limpeza com várias lavagens em água potável, para remover organismos, areias e outros detritos. Após lavagem da alga, procedeu-se à separação do primeiro grupo de amostras que foram utilizadas para a caracterização nutricional (humidade, cinzas, macronutrientes e minerais).

O segundo grupo de amostras foi utilizado no estudo da influência dos vários processos de secagem da *F. Vesiculosus*. Após recolha e lavagem da alga, procedeu-se à sua secagem por diferentes métodos:

- A) Secagem à sombra durante 8 dias;
- B) secagem com luz direta de sol durante 3 dias;
- C) secagem em estufa à temperatura de 65 °C durante 48 horas;
- D) congelação seguida de liofilização.

Todas as amostras secas foram moídas em moinho industrial, usando-se um filtro com 0,5mm de diâmetro de poro e armazenadas em exsiccador até utilização. Nestas amostras secas, foram analisadas a composição em ácidos gordos e conteúdos fenólicos, para avaliar possíveis variações nos diferentes tratamentos de secagem.

2.2 Avaliação da Composição Nutricional

A composição nutricional da alga em estudo foi avaliada de acordo com o proposto pelo método de Weende. Este método é também conhecido como método de análise centesimal ou proximal, e foi proposto por Henneberg em 1894 (Salman, Ferreira, Soares, & Souza, 2010), com base nos resultados de investigações realizadas na Estação Experimental de Weende, na Alemanha. Desde então, esse método vem sendo utilizado para se conhecer a composição química aproximada dos alimentos. As

técnicas ainda são quase as mesmas, com exceção do azoto, que é determinado hoje em dia pelo método Kjeldahl (Salman et al., 2010).

A Estação Experimental de Weende propôs a análise aproximada do alimento, também conhecida como composição centesimal. As análises clássicas comumente efetuadas visam obter informações sobre os seguintes conteúdos dos alimentos:

- humidade ou matéria seca;
- cinza ou matéria mineral;
- proteína bruta;
- gordura;
- extrato não nitrogenado;
- fibra bruta.

As amostras de alga usadas nesta avaliação (primeiro grupo de amostras) não sofreram qualquer tipo de tratamento de secagem inicial.

2.2.1 Determinação do teor de humidade

Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. Assim, a matéria seca é toda a fração do alimento excluída a água ou humidade natural (Salman et al., 2010).

Para a determinação do teor humidade, pesaram-se cápsulas previamente secas (colocadas a 105°C, durante 2 horas) na balança analítica (Sartorius Ag Gottingen, Alemanha). De seguida, colocou-se cerca de 4 gramas (g) de amostra em cada uma e levou-se à estufa a uma temperatura de 105°C durante a noite (aproximadamente, 10-12 horas). Após arrefecimento das cápsulas em exsiccador, foi efetuado o registo do seu peso seco, permitindo obter a percentagem (%) de humidade na amostra.

2.2.2 Determinação do conteúdo em cinzas

As cinzas representam o resíduo obtido por aquecimento da amostra seca à temperatura de 550-570°C. Note-se que nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem perder-se por volatilização (Salman et al., 2010). Para determinação das cinzas, a amostra

anteriormente utilizada para determinação da humidade foi de seguida levada à mufla, a uma temperatura de 550°C (Selecta, Select Horn) durante 3 horas. Após arrefecimento das cápsulas em exsiccador, foi registada a massa dos resíduos obtidos e calculada a % em cinzas na amostra.

2.2.3 Determinação do conteúdo em gordura

A determinação do teor de gordura das amostras de alga foi efetuada por extração de amostra seca (cerca de 2g) com o solvente éter dietílico, em aparelho do tipo Soxhlet, a 40°C durante 16 horas, seguida da remoção do solvente por evaporação em evaporador rotativo (Salman et al., 2010). De notar que, os resíduos obtidos não são constituídos unicamente por lípidos mas, por todos os compostos que nas condições da determinação possam ser extraídos pelo solvente. Esses compostos incluem ácidos gordos livres, ésteres de ácidos gordos, lecitinas, ceras, carotenóides, clorofila e outros pigmentos, fosfatídios, vitamina A e D, óleos essenciais, entre outros (Zenebron et al., 2). O teor em gordura (%) foi obtido através da medição da massa do extrato seco numa balança analítica (Sartorius Ag Gottingen, Alemanha).

2.2.4 Determinação do conteúdo em fibra bruta

A fibra bruta é a fração constituída por hidratos de carbono estruturais, obtida após a digestão ácida seguida de digestão básica (Salman et al. 2010). De notar que a principal limitação deste método está relacionada com o fato de não separar a celulose da hemicelulose e provocar a perda de parte da lignina (que não é considerada hidrato de carbono) e da hemicelulose. Este método fornece valores baixos devido à utilização de digestão muito drástica, levando à perda de alguns componentes (Salman et al. 2010). A sua determinação foi realizada a partir de 2gramas de amostra colocadas no digestor de fibras (Fibrotec, Labconco crude fiber extractor), a qual foi submetida à digestão com uma solução ácida, utilizando-se 200mL de ácido sulfúrico (12,5g/L), em ebulição durante 30 minutos. Após este procedimento, procedeu-se à filtração em vácuo (em cadinho de Gooch), que foi seguida por uma digestão em meio básico, com 200mL de hidróxido de sódio (12,5g/L), novamente colocada no aparelho Fibrotec (Labconco crude fiber extractor) em ebulição por 30 minutos. Depois de nova

filtração e concluída esta etapa, os cadinhos foram levados a 130°C durante 1 hora, seguido de posterior arrefecimento em exsiccador. O resíduo orgânico resultante foi colocado na mufla à temperatura de 590°C, durante 1 hora e, posteriormente, medido na balança analítica (Sartorius Ag Gottingen, Alemanha) para determinar o teor em fibra bruta (%).

2.2.5 Determinação do conteúdo em proteína bruta

A proteína bruta foi determinada indiretamente a partir do valor de azoto total, o qual é determinado por um método que se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação, durante 45 minutos a 450°C. A matéria orgânica existente nas 2g de amostra de cada amostra seca foi digerida com 12,00mL de ácido sulfúrico a 80% (m/v) e um catalisador (pastilha de selênio), para que o azoto fosse transformado em sulfato de amônio. De seguida, foi efetuada uma digestão com recurso a um bloco de digestão (Behr, Alemanha), a 450°C durante 45 minutos. A amostra digerida foi arrefecida, durante 30 minutos, tendo-se de seguida procedido à neutralização com cerca de 50,00mL de ácido bórico 4% (m/v) e 2-3 gotas de indicador vermelho de metilo. Após este procedimento, a amostra foi submetida a uma destilação no destilador automático do tipo Kjeldahl (Kjeltec System 1026 Distilling Unit), de forma a condensar o amoníaco libertado da amostra. Este amoníaco recuperado foi titulado com ácido clorídrico padronizado (0,09975N). A percentagem de proteína bruta foi estimada multiplicando-se a percentagem de azoto encontrada pelo fator de conversão de 6,25 (Campos et al., 2004).

2.2.6 Determinação do conteúdo em hidratos de carbono

A percentagem de hidratos de carbono nas amostras foi calculada por subtração dos componentes restantes de acordo com a seguinte fórmula: %Hidratos de Carbono = 100% - (%Humidade + %Cinza + %Proteína + %Gordura). A principal limitação dessa estimativa é que ela incorpora todos os erros das análises anteriores, principalmente, a da fibra bruta. Apesar disso, é um parâmetro considerado útil pois

essa imprecisão não é demasiado significativa e a determinação é bastante rápida e simples (Salman et al., 2010).

2.2.7 Determinação do conteúdo em minerais

As cinzas obtidas tal como descrito no item 2.2.2 foram utilizadas para determinação do teor em minerais. Para esta determinação foi realizada uma digestão ácida com ácido nítrico a 65% (m/v) em banho-maria (Precistern Selecta, Barcelona), a 100°C. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Por fim, o conteúdo foi filtrado com recurso a um funil e papel de filtro, para um balão volumétrico, e o volume posteriormente ajustado com água destilada. Os macroelementos (cálcio, magnésio, potássio e sódio) e microelementos (chumbo, zinco, crómio, cobre, manganês, ferro, níquel e cádmio) foram determinados através redissolução das cinzas e analisados num espectrofotómetro de absorção atómica (Perkin Elmer AAnalyst 300) equipado com uma lâmpada de cátodo oco correspondente a cada elemento. Os valores referentes aos macroelementos e microelementos foram expressos em gramas por 100g de amostra seca.

2.2.8 Determinação quantidade de fósforo

As cinzas foram dissolvidas em 10,00mL ácido clorídrico 37% (m/v) e sujeitas a evaporação em banho-maria a 100°C. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Por fim, o conteúdo foi filtrado, com recurso a funil e papel de filtro, para um balão volumétrico. A determinação de quantidade de fósforo foi efetuada através da curva padrão pipetando volumes conhecidos de solução padrão de fosfato (K_2HPO_4). Foram preparados uma série de balões volumétricos de 50mL com os volumes de solução padrão de vanadato-molibdato (0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 mL) perfazendo o volume restante com água destilada. Aguardou-se, pelo menos, 10 minutos pelo desenvolvimento de cor. Foram medidas as absorvâncias correspondentes à coloração obtida em espectrofotómetro ultravioleta-visível a 470nm. Os níveis de fosfato foram obtidos nas unidades de mg/100g alga seca.

2.3 Avaliação da composição química dos processos de secagem

Na segunda parte deste trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito de 4 processos de secagem no perfil de ácidos gordos e nos conteúdos totais de compostos fenólicos nas amostras do segundo grupo (ver secção 2.1).

2.3.1 Determinação do perfil em ácidos gordos

O processo de catálise básica é, de uma forma geral, mais rápido do que a catálise ácida. Esta característica, a par com o facto dos catalisadores alcalinos serem menos corrosivos do que os ácidos, torna os processos de catálise básica mais atrativos. Como catalisadores alcalinos podem ser utilizados alcóxidos (metóxido de sódio e etóxido de sódio) e hidróxidos de metais alcalinos (hidróxido de potássio e de sódio). De entre os catalisadores referidos, a utilização de hidróxido de potássio (2M em metanol) é frequentemente recomendada pois é uma reação rápida e ocorre à temperatura ambiente (Christie, 1993).

2.3.1.1 Procedimento experimental

Para determinação do perfil em ácidos gordos nas amostras da alga sujeitas a diferentes métodos de secagem recorreu-se à extração por *n*-hexano e metilação básica. Inicialmente procedeu-se à preparação de uma solução de hidróxido de potássio 2M (5,60g KOH adicionados a 20,00mL de metanol e dissolvidos com agitação lenta). De seguida, pesaram-se cerca de 0,30g de amostra de cada processo de conservação testado, para um tubo de ensaio (16mL). Adicionaram-se 2,00mL de *n*-hexano com recurso a uma pipeta volumétrica e posteriormente 0,20 mL de KOH em metanol com ajuda de uma micropipeta. Levou-se a agitar no vortex por 3 minutos e deixou-se repousar meia hora. Decorrido este tempo, agitou-se 1 minuto em vortex e adicionou-se, numa hotte, 2 gotas de ácido acético glacial, agitando-se novamente no vortex por 1 minuto. Adicionaram-se 6 espátulas pequenas de sulfato de sódio anidro

e levou-se a agitar por 2 min. Por fim, transferiu-se a fase *n*-hexano para uma seringa com filtro de nylon 0,2 μ m, que permitiu a filtração da solução para um vial, que foi armazenado a -25°C até ser analisado por GC. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. Para identificação dos ácidos gordos presentes nas amostras da *F. vesiculosus* utilizou-se a mistura de padrões de 37 ácidos gordos da Supelco™ Component FAME MIX cuja composição está descrita no Anexo I.

2.3.1.2 Equipamento e condições da análise

Para análise por cromatografia gasosa usou-se o equipamento da marca DANI modelo GC1000 com injetor split/splitless e um detetor FID. A coluna usada foi uma cianopropil-metil-50% fenilmetilpolisiloxano (Macherey-Nagel, Duren, Alemanha) de tamanho 30m x 0,32mm com 0,25 μ m de espessura de fase estacionária. O programa do gradiente de temperatura do forno foi o seguinte: durante 2 min, manteve-se a temperatura inicial da coluna de a 50°C durante 2 min; subiu-se a 30°C/min até aos 125°C; de seguida, subiu a 5°C/min até aos 160°C e depois subiu-se a 20°C/min até aos 180°C; novamente subiu-se 3°C/min até aos 200°C e por fim, subiu-se a 20°C/min até aos 220°C, mantendo a temperatura constante durante 15min. O fluxo do gás de arrasto (H₂) foi de 4,0mL/min, medido a 50°C. A temperatura do injetor é 250°C e a do detetor 260°C. A quantidade de amostra injetada é de 1 μ L e introduzida na coluna com um “split” de 1:40. A análise cromatográfica foi efetuada com recurso ao programa CSWDataApex versão 1.7. A identificação dos ácidos gordos no cromatograma da amostra obtido foi efetuada por comparação dos tempos de retenção com os obtidos para um padrão de mistura de vários ácidos gordos (Anexo I). A composição em ácidos gordos para cada amostra analisada foi expressa em percentagem relativa.

2.3.2 Determinação do conteúdo em compostos fenólicos

Na identificação e quantificação de compostos fenólicos em extratos de produtos naturais utilizam-se principalmente métodos de separação como a cromatografia líquida (acoplada a detetores de espectrometria de massa, ultravioleta, fluorescência

ou diodo-array) e cromatografia gasosa (acoplada a detetores de FID e/ou massa). Estas técnicas analíticas exigem, em geral, técnicos com vasta experiência e procedimentos elaborados. Por isso, a alternativa simples é muitas vezes a de determinação dos compostos fenólicos totais, usando o método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu que envolve a reação de um reagente colorimétrico com os compostos fenólicos. Note-se no entanto que, esta metodologia tem vários interferentes como por exemplo o ácido ascórbico ou os açúcares redutores. Neste âmbito, há necessidade de outras técnicas para quantificar os compostos fenólicos (em geral, compostos electroactivos) e, também, estabelecer a capacidade antioxidante de substâncias como, por exemplo, as técnicas electroquímicas de voltametria cíclica, a voltametria de impulso diferencial e a voltametria de onda quadrada. Estas técnicas são de simples procedimentos experimentais e rápidas na análise dos compostos fenólicos. Na avaliação da capacidade antioxidante, os estudos nesta área mostram que um baixo potencial de oxidação está associado a um elevado poder antioxidante e têm sido aplicadas na caracterização de uma variedade de antioxidantes incluindo ácidos fenólicos, flavónoides e tocoferóis em amostras sintéticas e reais. Exemplos específicos são os da sua utilização destas técnicas da capacidade antioxidante da batata-doce (Teow et al., 2007), na capacidade de eliminação de radicais livres em reações de Maillard (Morales e Jime, 2001) e na oxidação lipídica (Hur et al., 2004). É importante referir que estas técnicas permitem obter dados experimentais complementares aos normalmente obtidos pelas metodologias tradicionais, que são baseados na espectrofotometria ultravioleta-visível. Dentro destes últimos, alguns dos testes mais usados na determinação da capacidade antioxidante de compostos isolados ou de mistura de compostos incluem:

- capacidade de bloquear radicais livres como, por exemplo, os formados pelo DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) (Morales e Jime 2001);
- capacidade bloqueadora e quelante do oxigénio radicalar (ORAC) com diferentes espécies reativas (com um gerador de radicais peróxido, hidróxido, superóxido ou um metal de transição), usando trolox como padrão (Teow et al., 2007);
- determinação do poder redutor de uma amostra, baseando-se na tendência dos antioxidantes reduzirem o catião Fe^{3+} a Fe^{2+} (Wu et al, 1999);
- promover ou inibir processos de oxidação em lípidos usando o ácido linolénico linoleico como sistema modelo (Hur et al., 2004).

2.3.2.1 Voltametria cíclica

Os compostos fenólicos são electroativos e, por isso, podem ser estudados por métodos eletroquímicos através de reações de oxidação e redução. A voltametria cíclica é a técnica eletroanalítica mais aplicada na avaliação das propriedades redox de compostos isolados ou de mistura. Um voltamograma cíclico é obtido pela aplicação de um varrimento linear de potencial (o potencial aumenta ou diminui linearmente com o tempo) ao eléctrodo de trabalho. Durante este processo de variação do potencial, uma corrente flui através do eléctrodo que oxida ou reduz o composto a analisar. A intensidade desta corrente é proporcional à concentração do composto na solução, permitindo a aplicação desta técnica na quantificação analítica.

2.3.2.2 Equipamento e material analítico

O Sistema voltamétrico consistiu num “Screen-printed chip” da DropSens com três eléctrodos (os eléctrodos de trabalho, auxiliar e de referência eram de platina). Os sensores eletroquímicos foram ligados a um equipamento potenciostato-galvanostato (PG580, Uniscan). Para controlar as condições de análise com este equipamento usou-se o Software UiEChem versão 1.34 (Unisan Instruments Ltd), instalado num computador PC, permitindo também adquirir os sinais de voltametria.

A análise foi efetuada por colocação de uma gota de 15 μ L da solução de teste (Figura 2.1) de forma a submergir os três eléctrodos. A função do potencióstato é a de aplicar e manter o potencial entre o eléctrodo de trabalho e de referência enquanto ao mesmo tempo mede a intensidade de corrente no eléctrodo de trabalho (a carga flui entre o eléctrodo de trabalho e o auxiliar). O sistema é controlado por computador, registando o CV (gráfico da intensidade de corrente versus potencial).

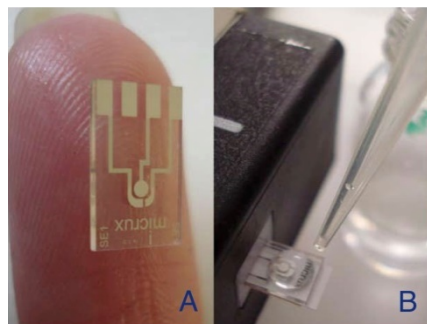


Figura 2.1 – A) Chip da Micrux com três eléctrodos de platina; B) Aplicação de 15 μL da solução teste para a análise por voltamétrica

2.3.2.3 Informação no voltamograma cíclico

A Figura 2.2 apresenta um voltamograma cíclico típico da solução redox de 5mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ obtido com o chip da Micrux. Nesta representação, os valores de potencial estão presentes no eixo das abcissas com potenciais mais positivos (ou oxidantes) representada à direita e potenciais mais negativos (ou redução) à esquerda. A intensidade de corrente é representada no eixo das ordenadas do voltamograma, com a corrente catódica (isto é, redução) no sentido negativo e corrente anódica (isto é, oxidação) no sentido positivo.

Os picos que aparecem num CV são parecidos com os encontrados num cromatograma, ou seja, onde cada pico é electroactivo em determinados valores de potencial e a altura do pico é proporcional à sua concentração. Os picos num CV são assimétricos (lado da frente íngreme e lado traseiro caindo gradualmente) quer num varrimento direto quer num indireto (direção do fluxo da corrente é invertida), embora com mesma forma geral.

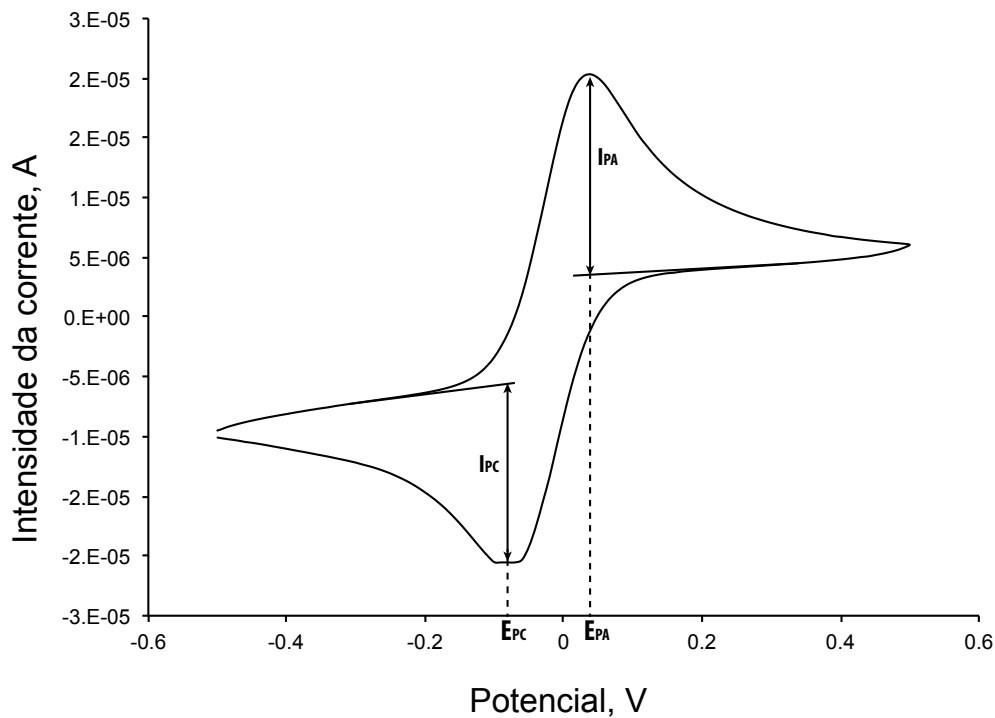


Figura 2.2 - Voltamograma cíclico

O CV permite obter informação quantitativa, como por exemplo, se a reação do par redox é reversível. Através da diferença entre o potencial de pico no varrimento anódico (E_{PA}) e o potencial de pico no varrimento catódico (E_{CA}) obtém-se o valor ΔE_{pico} que, para uma reação reversível, satisfaz a relação,

$$n \times \Delta E_{pico} = 59 \text{ mV}$$

onde n é o número de eletrões implicados no par redox. Também no caso do processo reversível, a intensidade de corrente no pico de corrente anódica, I_{PA} , é igual à do pico de corrente catódica, I_{PC} , obtendo-se a relação esperada de

$$I_{PA} / I_{PC} = 1$$

A informação quantitativa em relação à concentração do(s) composto (s) electroativo(s) pode ser obtido a partir do voltamograma utilizando a equação de Randles-Sevcik. Esta equação, a 25°C (298K) mostra uma relação entre a intensidade de corrente de pico, I_p (quer anódica ou catódica) e a concentração do analito (C),

$$I_p = 2.687 \times 10^5 \times n^{3/2} \times v^{1/2} \times D^{1/2} \times A \times C$$

onde o n é o número de elétrons que envolvidos na reação para o par redox, v é a velocidade à qual o potencial é varrido (V/s), A é a área do eletrodo (cm^2) e D é o coeficiente de difusão do composto a analisar (cm^2/s), tendo a constante as seguintes unidades: $2.687 \times 10^5 \text{ C mol}^{-1} \text{ V}^{-1/2}$).

2.3.2.4 Preparação da amostra e de soluções

Hexacianoferrato de potássio (III) ($[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e hexacianoferrato de potássio (II) ($[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$) foram obtidos com marca da Acros Organics e dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) da Merck. O Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido ascórbico e hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) foram adquiridos à Panreac. O etanol de qualidade HPLC foi adquirido à Labscan. Todos os produtos químicos eram de grau analítico e usados tal como recebidos.

2.3.2.5 Soluções para análise com voltametria cíclica

A solução tampão de fosfato salina (PBS) foi preparada com as concentrações de 137 mM NaCl , 8,1 mM Na_2HPO_4 e 1,47 mM KH_2PO_4 com o pH ajustado a 7,0. A solução redox foi sempre preparada de fresco, a fim de obter uma solução com uma concentração de 5 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1).

Seis soluções padrão de calibração de ácido ascórbico foram preparadas com concentrações de 176, 352, 705, 1057, 1409 e 1761 mg/L usando como solvente a solução tampão de fosfato (PBS) de pH=7 (permite ter uma matriz iônica que facilita a condução elétrica). Para manter a matriz das soluções padrão de calibração mais próxima das amostras foi adicionado etanol antes do aferimento de cada solução (na proporção, 2,00 mL etanol: 25,00 mL volume solução). Para a lavagem dos eletrodos entre as análises voltamétricas preparou-se duas soluções: solução 0,5M H_2SO_4 e solução 0,01M KCl com 0,1M H_2SO_4 .

A análise das 4 amostras de macroalga *F. Vesiculosus* foi efetuada em triplicado, a extratos etanólicos preparados da seguinte forma: medir uma massa superior a 0,1g e adicionar 10,00mL de etanol; agitar a mistura, de 10 em 10 minutos, durante aproximadamente uma hora; filtrar a solução e medir 2,00mL do filtrado para um balão volumétrico de 25,00mL, cujo volume foi ajustado com solução PBS.

2.3.2.6 Condições experimentais da análise

Os voltamogramas das soluções padrão de calibração, solução de controlo de qualidade e das amostras foram registados entre os potenciais de -2,0 e 1,6V, a uma velocidade de varrimento de 100mV/s. Para cada medição, foram realizados dois scans, correspondente a um tempo total de análise menor do que 2 minutos.

O método de calibração com padrões externos foi utilizado para calibrar o sistema para a medição dos conteúdos totais de compostos fenólicos nas amostras que sofreram os processos de secagem.

O processo de lavagem do Chip entre análises foi efetuada usando duas soluções de lavagem; na primeira lavagem usou-se a solução solução 0,5M H₂SO₄ e, na segunda, a solução 0,01M KCl com 0,1M H₂SO₄. Cada umas das soluções foi colocada no chip da Micrux e a lavagem da superfície de ouro foi efetuada fazendo 10 ciclos voltamétricos por variação do potencial entre -1 e +1V, a uma velocidade de varrimento de 100 mV/s. A solução redox [Fe(CN)₆]^{-3/4}, usada para testar se as lavagens foram eficientes, foi analisada realizando 2 scans entre os potenciais de -0.5 e +0.5V com uma velocidade de varrimento de 100mV/s.

3 Resultados e Discussão

Numa primeira fase de discussão apresentam-se os resultados obtidos na caracterização da composição nutricional da *F. vesiculosus*. Numa segunda etapa faz-se a apresentação do perfil de ácidos gordos obtidos nas amostras de alga que sofreram quatro métodos de secagem. Por fim, mostram-se os resultados dos ensaios preliminares sobre quantificação dos fenóis totais extraídos das amostras secas da *F. vesiculosus* por análise eletroquímica usando voltametria cíclica.

3.1 Caracterização da composição nutricional

Na caracterização da composição em macronutrientes e minerais foi feita uma comparação dos resultados com outros estudos de algas, inclusive a *F. Vesiculosus* e, comparou-se também, o valor nutricional com o que está presente noutros alimentos. No entanto, tem de se referir que uma porção de alga são apenas 8g de alga seca, por isso torna-se difícil uma ingestão do total de nutrientes presentes em 100gramas de alga.

3.1.1 Macronutrientes

Na tabela 3.1 encontram-se os resultados médios obtidos das análises aos principais nutrientes (% de humidade, cinza, lípidos, fibra, proteína bruta e hidratos de carbono) para a *F. vesiculosus*, obtidos de 3 repetições usando o método analítico Weende. Os procedimentos usados para os diferentes macronutrientes encontram-se no capítulo 2.2. Os resultados médios mostram que há uma variação elevada na análise de percentagem (%) nos conteúdos de hidratos de carbono e fibra bruta, enquanto que nos restantes parâmetros, a variação é mínima.

Tabela 3.1 – Caracterização da composição nutricional da alga *F. vesiculosus*.

	\bar{X}	s	sr%
Amostra natural			
Humidade (%) 105°C	85,80	0,01	0,01
Amostra seca			
Cinza (%) 550°C	26,2	0,1	0,5
Lípidos (%)	2,8	0,05	1,8
Fibra bruta (%)	11	2	23,5
Proteína (%)	11	0,2	1,8
Hidratos de Carbono (%)	21	13	62,6

\bar{X} – média; s = desvio padrão; sr% = desvio padrão relativo percentual

A alga analisada apresenta conteúdos em macronutrientes semelhantes ao descrito em outros estudos para a mesma alga ou da mesma espécie (alga castanha *Fucus sp.*) (Bocanegra et al., 2009; Hahn et al., 2012; Kanda et al., 2014; Maehre et al., 2014).

Humidade. A percentagem de humidade para a alga em estudo foi de 85,80±0,01, Este valor está concordante com os valores descritos de humidade para as algas *Fucus sp.* por Bocanegra (2009), onde foi demonstrando que os valores de humidade nesta alga são elevados, podendo variar entre 80% e 90% para a alga fresca (Bocanegra et al., 2009).

Cinza. O valor de cinza encontrado está de acordo com o descrito por Fleurence (1999), que indicou que os valores de cinzas (inceneração a 550°C) nas algas são

variáveis entre 8 a 40% do seu peso seco e próximo do valor encontrado por Rupérez, 2002 que foi de 30% (incineração a 550°C) (Fleurence, 1999b; Rupérez, 2002).

Lípidos. O conteúdo em lípidos para a amostra seca, apresenta um valor que está de acordo com resultados apresentados na literatura de revisão de Pereira (2012), onde foram consideradas todas as variedades de algas e se referiu que a % de lípidos pode variar até 3,0%. Mas, também pode ser considerado um valor alto, quando comparado com o descrito por Sánchez-Machado et al. (2004) para as algas *Himanthalia elongata* 0,93% de lípidos) e *Undaria pinnafida* (1,03% de lípidos).

Teor de fibra bruta. Ao nível da fibra bruta obtida (englobada nos hidratos de carbono) para a amostra analisada verificou-se o valor obtido corresponde a cerca de metade do valor total de hidratos de carbono. Este resultado é similar ao apresentado noutro estudo com algas castanhas (MacArtain et al., 2007), sendo um resultado bom do ponto de vista alimentar (superior a níveis apresentados em outro alimentos, como pode ser verificado na Tabela 3.2). Consumindo uma porção de algas (cerca de 8 g de alga seca) pode contribuir com aproximadamente de 11% das 24 g diárias propostas pelas Dietary Guidelines (GDA's) (Agriculture e Services, 2010), traduzindo-se no bom funcionamento do intestino, uma vez que não sendo ingerida, contribui para o normal funcionamento do transito intestinal, para a produção de bactérias através da fermentação e contribui ainda para a diminuição da % de absorção de açúcares e gordura (Mabeau, 1993).

Proteína. O valor de proteína bruta obtida é semelhante ao obtido em estudo similar com 2 algas do género *Fucus sp.* (valores no intervalo de 3 a 11%), a alga *Ascophillum nodosuum* (valores a variar entre 3 e 15%) (Fleurence, 1999b) e para a *F. vesiculosus* (10%) (Hahn et al., 2012). O valor obtido é cerca de metade quando comparado com níveis do grão de soja secos (na Tabela 3.2). Por fim, também se verificou que a *F. vesiculosus* apresentou níveis superiores aos encontrados em algumas leguminosas (favas e ervilhas secas) consideradas fornecedoras de alto valor de proteína vegetal.

Tabela 3.2 – Valores nutricionais de vários alimentos (tal como são comprados para consumo), retirados da Tabela de Composição de Alimentos (2007), para comparação dos obtidos para a *F. vesiculosus*.

Alimento em cru (100g)	Nutrientes			
	Fibra	H.C	Lípidos	Proteína
Lentilhas	11,8	47,6	0,7	25,2
Cenoura	2,6	4,4	0	-
Maçã	2,1	13,4	-	-
Sardinha	-	-	16,4	-
Soja em grão	-	-	19,3	32,8
Bife de Vaca	-	-	4,3	20,9
Ervilha	-	-	0,7	6,4
Favas	-	-		7,4

Hidratos de carbono. Na análise de hidratos de carbono obtiveram-se resultados com uma grande dispersão (precisão má), que foi atribuída à metodologia usada, que consistiu na utilização de uma fórmula de cálculo. Uma vez que considera os dados analíticos de outros parâmetros, o resultado final depende dos erros acumulados. Comparando com resultados anteriores, verificou-se que é um resultado aceitável. O valor médio obtido é superior aos valores obtidos em trabalhos anteriores como por exemplo, o estudo efetuado por MacArtain et al. (2007) que obteve valores de 13,1g/100 g de matéria seca para as algas castanhas *Ascohyllum nodosum*, e 15,0g/100g de matéria seca para a *Undaria pinnafida*. Comparando com os resultados apresentados no estudo de Pereira (2012), o valor médio obtido está inserido no intervalo que é referido para a quantidade de hidratos de carbono para algas castanhas (pode atingir até valores de 46,8g/100g de matéria seca). E por fim, comparando com os resultados obtidos por Hahn et al. (2012), para a mesma alga (*F. vesiculosus*) foi de 47,8%, constatando-se que o valor obtido neste estudo é cerca de metade. No entanto, estas diferenças podem dever-se ao local onde a alga foi colhida ou à sazonalidade, já que o conteúdo em nutrientes pode variar com estes factores.

3.1.2 Minerais

As algas são ricas em minerais, devido ao meio que habitam e à absorção de elementos presentes no meio. As algas castanhas, tal como a *F. vesiculosus*, são consideradas bioacumuladoras de muitos elementos minerais e são consideradas uma boa fonte de magnésio, cobre, ferro e iodo (Maehre et al., 2014; Rupérez, 2002).

Na Tabela 3.3 mostram-se os resultados das análises aos conteúdos de minerais (cálcio, potássio, magnésio, sódio, ferro, cobre, zinco e fósforo) na *F. Vesiculosus*. Adicionalmente, esses valores são comparados com os de vários alimentos retirados da Tabela de Alimentos Portuguesa e considerados fontes nutricionais dos mesmos minerais em estudo.

Tabela 3.3 – Composição em macronutrientes da *F. vesiculosus* recolhida na praia da Barra (Aveiro) e comparação dos valores com os de vários alimentos (em cru) da Tabela de Composição de Alimentos

Alimento	Minerais							
	Cálcio (Ca)	Potássio (K)	Magnésio (Mg)	Sódio (Na)	Ferro (Fe)	Cobre (Cu)	Zinco (Zn)	Fósforo (P)
	Alga (mg/100 g alga húmida)							
<i>F. vesiculosus</i>	810	2771	814	3302	15	0,1	6	47
	Alimentos em cru (mg/100 g alimento)							
Leite	109	160	9	43	0,1		0,4	77
Queijo cheddar	720	77	25	670	0,3	0		
Bife de Vaca	9	370	23	60	1,4	0,1	3,6	169
Espinafes	104	471	54	173	2,4	0	0,9	45
Lentilhas	74	940	114	12	6,8	1	3,9	-

Globalmente, os dados apresentados mostram que as concentrações de minerais encontrados na alga são superiores em todos os parâmetros aos outros alimentos (ver Tabela 3.3) com exceção dos conteúdos em fósforo. Do ponto de vista nutricional,

estes resultados mostram que a alga *F. vesiculosus* é uma excelente fonte alimentar de minerais. Por exemplo, a DRI (do Inglês, *Dietary Reference Intake*; Anexo 2) indica que um adulto saudável (30 a 50 anos) deve consumir, idealmente, 1000mg de cálcio por dia. Tendo em conta esta informação, a alga pode ser considerada uma possível fonte para utilizar como suplemento alimentar deste mineral, contribuindo para uma dieta saudável e variável pois, 100 g de alga fornecem 810 mg de cálcio. O mineral com a concentração na alga mais elevada é o Na, seguido do K. Verificou-se, tal como o esperado, apesar do valor elevado de Na, que a razão Na/K na alga é baixa (1,19) mostrando que os níveis de K são elevados e, por isso, podendo ser usada para contrabalançar as dietas ocidentais com baixo teor de K (Cardoso et al., 2014). Verificou-se também, que a *F. vesiculosus* apresenta níveis elevados de ferro (15mg/100 g de amostra seca), superior ao encontrado no bife de vaca ou nas lentilhas, que são produtos alimentares considerados boas fontes deste mineral (MacArtain et al., 2007).

Os resultados apresentados neste estudo, mostram ser comparáveis com os obtidos noutra trabalho, usando várias espécies de algas castanhas colhidas em Espanha: *F. vesiculosus*, *Laminaria digata* e *Undaria pinnatifida* (Rupérez et al., 2002). Na Figura 3.1, apresenta-se uma comparação dos resultados obtidos neste estudo com os do trabalho apresentado por Rupérez (2002).

A Figura anterior mostra que, os níveis de minerais obtidos neste estudo são, em geral, ligeiramente inferiores mas, verificou-se que há uma relação linear razoável entre os níveis de minerais entre a amostra da *F. vesiculosus* utilizada neste estudo e a amostra da mesma alga, utilizada no estudo de Rupérez (2002) ($R=0,98$), o que não acontece para as outras espécies de alga. As diferenças encontradas para a mesma alga (*F. Vesiculosus* (Aveiro) e *F. Vesiculosus* (Pontevedra)) podem ser atribuídas a alguns factores anteriormente descritos por exemplo, o local de colheita, a época do ano e ainda o processo de lavagem que pode levar alguns minerais por arrasto (Chan et al., 1997).

Os metais pesados podem ser tóxicos, quando é ultrapassado o consumo de certos níveis de concentração. Foram por isso, analisados alguns desses metais na alga em estudo: manganês, crómio, chumbo, cádmio e níquel. Verificou-se que, em geral, os níveis apresentados tinham valores inferiores a 5,6 mg/100 g de amostra seca. Os

níveis obtidos para o crómio e cádmio foram de $0,16\pm 0,01$ e $0,06\pm 0,01$ mg/100 g de amostra seca. No caso do níquel e chumbo obtiveram-se os valores de $0,64\pm 0,05$ e $0,47\pm 0,02$ mg/100 g de amostra seca, respetivamente; destes metais, o manganês foi o que apresentou os níveis mais elevados ($5,6\pm 0,2$ mg/100 g de amostra seca).

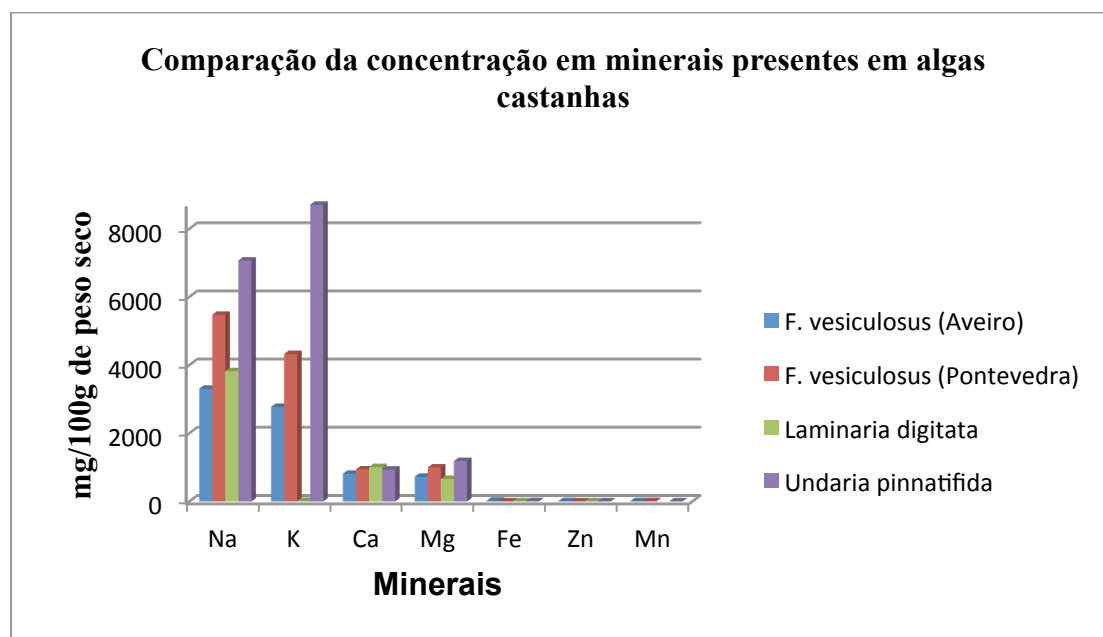


Figura 3.1 – Gráfico de barras comparando as concentrações de minerais obtidos em algas neste estudo com os do trabalho apresentado por Rupérez (2002)

O limite máximo permitido (Regulamento (CE) nº1881/2006) para o chumbo (Pb) é de 5mg/Kg de amostra seca e para o cádmio, de 0,1mg/Kg de amostra seca (Besada et al., 2009). Verificou-se que a alga colhida na barra (Aveiro) tem níveis de chumbo abaixo do limite máximo referido (4,6mg/kg de amostra seca) mas, superior no caso do cádmio (0,6mg/kg amostra seca) mostrando que para o consumo de algas recolhidas na Costa Portuguesa é necessário efetuar o controlo de qualidade ao nível dos metais pesados. Esta situação é explicada pelo facto de as algas serem bioacumuladores.

3.2 Caracterização do perfil em ácidos gordos

A análise por cromatografia gasosa dos ácidos gordos às amostras de *F. Vesiculosus* que sofreram diferentes tipos de secagem (sombra, sol, liofilização e estufa) é relevante pois, este grupo de compostos são sensíveis a processos oxidativos e, por isso, possivelmente o processo de secagem afeta o perfil lipídico. Também, se torna importante estudar os ácidos gordos do ponto de vista nutricional, devido à importância que os $\omega 3$ passaram a ter na dieta, não sendo apenas considerados nutrientes essenciais, mas também favoráveis na modulação de algumas doenças (Connor, 2000).

Na globalidade, a partir de todos os perfis de ácidos gordos obtidos, foi possível identificar 29 ácidos gordos nas diferentes amostras da *F. vesiculosus*. Alguns dos ácidos gordos não são comuns a todas as amostras analisadas e apresentam níveis percentuais geralmente baixos (<0.6%). Por exemplo, verificou-se que havia evidência da presença dos ácidos gordos: C6:0 e C18:2n6t nas amostras de sombra; C20:2Cis-11, C20:3n3, C22:0 e C24:0 em todas as análises às amostras da estufa e em metade das análises às da sombra; C22:1n9, presente em todas as análises de amostras liofilizadas e em metade das de sombra; C21:0 que foi identificado só em amostras de estufa; C10:0 detectado em amostras de sombra e estufa.

Considerando que estas são situações pontuais, os dados destas variáveis não foram considerados nos tratamentos de dados a seguir apresentados, resultando numa matriz de dados com 20 ácidos gordos. Para facilitar o tratamento estatístico dos dados obtidos, foi colocado como zero de concentração nas situações onde o ácido gordo não foi detectado na análise. Seis novas variáveis foram obtidas por cálculo usando a informação cromatográfica: ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), ácidos gordos polinsaturados (PUFA), ácidos gordos polinsaturados $\omega 3$, ácidos gordos polinsaturados $\omega 6$ e razão $\omega 6/\omega 3$.

Na Tabela 3.4, apresentam-se as 26 variáveis em estudo (20 ácidos gordos identificados e que são comuns a todas as corridas e 6 variáveis calculadas daquelas), bem como, os valores mínimos e máximos, as médias e os desvios padrão. Os resultados obtidos para cada ácido gordo mostram uma grande variabilidade, como era esperado por serem obtidos de 4 processos de secagem diferentes. Tendo-se obtido desvios padrões relativos percentuais a variar entre 13% e 122%.

Considerando esta variação, espera-se que as quantidades de ácidos gordos para os 4 tratamentos da amostra (diferentes tipos de secagem) mostrem diferenças significativas. Os resultados médios são importantes para estabelecer comparações com resultados obtidos noutros estudos.

Tabela 3.4 - Perfil de ácido gordos presentes nas amostras *Fucus vesiculosus* que sofreram diferentes tipos de secagem, apresentando-se os valores (% alga seca) mínimos (min), máximos (max), das médias e dos desvios padrão (s).

Ácido gordo	Média	s	min	max
C8_0	0.025	0.016	0.011	0.064
C12_0	0.061	0.019	0.033	0.091
C13_0	0.055	0.067	Nd	0.224
C14_0	9.60	2.06	6.80	12.38
C14_1	0.088	0.020	0.053	0.124
C15_0	0.428	0.156	0.207	0.700
C16_0	15.2	3.6	9.9	20.0
C16_1	1.01	0.42	Nd	1.71
C17_0	2.94	3.59	0.26	11.21
C17_1CIS.10	0.159	0.123	Nd	0.356
C18_0	1.10	0.25	0.87	1.97
C18_1n9c.t	33.5	4.9	25.2	43.7
C18_2n6c	6.80	1.13	5.55	9.73
C18_3n6	0.446	0.196	0.170	0.741
C18_3n3	6.55	1.83	4.23	9.10
C20_0	0.153	0.085	0.069	0.460
C20_1CIS.11	0.150	0.130	Nd	0.570
C20_3n6	0.460	0.430	0.010	1.39
C20_4n6	11.6	11.1	0.017	25.2
C20_5n3	9.11	3.99	4.20	14.16
SFA	29.6	7.4	18.7	40.2
MUFA	34.9	5.1	25.3	45.2
PUFA	34.9	6.6	22.5	43.1
ω 3	15.7	5.7	9.1	22.7
ω 6	19.2	10.1	7.6	31.7
ω 6/ ω 3	1.60	1.18	0.34	3.05

Observando o descrito na tabela, é possível verificar que a *F. vesiculosus* usada é rica em SFA, MUFAs e PUFAs o que vai de encontro ao descrito por Chan (Chan et al., 1997). Ao contrário do descrito noutros artigos (Chan et al., 1997; Sánchez-Machado et al., 2004) o ácido gordo mais abundante não é o C16:0, e sim o C18:1n9ct, seguido de C16:0. Os ácidos gordos que no geral, são mais frequentes pertencem à família de C18 e C20, tal como descrito por Sánchez Machado (2004). De referir que a metodologia usada para extração e derivatização dos ácidos gordos é diferente da aplicada nos trabalhos descritos. Neste trabalho procurou-se evitar utilizar temperaturas elevadas no procedimento analítico e, por isso, alguma variação entre resultados pode ser atribuída às diferenças no procedimento analítico. Neste trabalho também foi possível verificar, que a *F. Vesiculosus*, independentemente do tipo de tratamento de secagem, apresenta os ácidos gordos essenciais C18:2n6, C18:3n3, C20:4n6 e C20:5n3, que também foram referidas num trabalho com algas castanhas em Southern Yemen (Tabarsa et al. 2012). Diferenças encontradas no perfil de ácidos gordos obtido para a mesma alga, verificaram-se ao nível dos conteúdos em SFA, tendo sido identificados os ácidos gordos C8:0, C12:0, C13:0, C15:0, C17:0 e C20:0 que não aparecem descritos por Maehre (2014). Apesar de terem sido identificados estes ácidos gordos, verifica-se que estão em quantidades muito reduzidas. Esta variação no perfil pode dever-se também, além do método experimental usado, da mistura de padrões de referência utilizado para identificação de ácidos gordos.

Para averiguar se há interdependência entre variáveis (correlação) efetuou-se o estudo de correlações entre as 26 variáveis definidas. Na Tabela 4.5 mostra-se a matriz de correlações obtida. Pela tabela de correlação é possível verificar que existe uma forte correlação positiva entre a presença dos ácidos gordos: C20:5n3 com C18:3n6 (R=0,91); SFA com C16:0 e C18:3n3 (R=0,94); MUFA com C18:1n9c; ω 3 com C18:3n6 (R=0,91); ω 3 com C20:5n3 (R=0,99) e a razão ω 6/ ω 3 com C20:4n6 (R=0,93) e ω 6, indicando uma relação direta entre os níveis de concentração. Por outro lado, com uma correlação negativa forte temos os ácidos gordos: C20:4n6 com C16:0 (R=-0,93); PUFA com C20:4n3 (R=-0,93); PUFA com C14:0 (R=-0,91); ω 6 com C16:0 (R=-0,96) e SFA (R=-0,95); ω 6/ ω 3 com C18:3n3 (R=-0,96), SFA (R=-0,94) e ω 3 (R=-0,91) e ω 6 (R=0,95). Com alguma correlação positiva (entre 0,8 e 0,9) estão os ácidos gordos: C14:0 com C12:0 (0,86); C16:0 com C8:0 e C14:0 (0,85); C18:3n6 com C17:0; C18:3n3 com C16:0 (0,88) e C18:1n9ct (0,84); C20:5n3 com

C18:3n3 (0,89); PUFA com C20:4n6 (0,88); ω 3 com SFA (0,84) e ω 6 com PUFA (0,85).

Para averiguar se há diferenças significativas entre as médias das amostras que sofreram diferentes processos de secagem, começou-se por efetuar o estudo de homogeneidade de variâncias (teste de Levene) dos resultados obtidos para cada ácido gordo entre os 4 tratamentos, de forma, a estabelecer o teste a aplicar: ANOVA de um fator, se houver homogeneidade de variâncias; Teste Welch se não houver homogeneidade de variâncias. No estudo da normalidade aplicou-se o conceito do teorema do limite central, que indica que na presença de pequeno número de dados em cada grupo (inferior a 10) é aceitável assumir a normalidade. Para análise estatística do perfil em ácidos gordos nas diferentes amostras recorreu-se ao programa de estatística “open source – R”. Na Tabela 3.6 resumem-se os resultados obtidos da aplicação do teste de Levene, da ANOVA de um fator ou Welch e dos testes Pos-Hoc, ao nível de comparação das médias (representadas por letras).

Tabela 3.5 - Matriz de correlações para as 26 variáveis associadas ao perfil de ácidos gordos

	C8_0	C12_0	C13_0	C14_0	C14_1	C15_0	C16_0	C16_1	C17_0	C17_1CIS.10	C18_0	C18_1n9c.t	C18_2n6c	C18_3n6	C18_3n3	C20_0	C20_1CIS.11	C20_3n6	C20_4n6	C20_5n3	SFA	MUFA	PUFA	n3	n6	n6.n3
C8_0	1.00																									
C12_0	0.71	1.00																								
C13_0	0.71	0.65	1.00																							
C14_0	0.66	0.86	0.56	1.00																						
C14_1	0.46	0.50	0.53	0.31	1.00																					
C15_0	0.39	0.22	0.41	0.59	-	1.00																				
C16_0	0.82	0.74	0.55	0.85	0.13	0.61	1.00																			
C16_1	0.77	0.80	0.70	0.63	0.58	0.16	0.68	1.00																		
C17_0	0.15	-	-	-	-	0.25	0.42	-	1.00																	
C17_1CIS.10	0.00	0.57	0.36	0.51	0.41	0.21	0.10	0.26	-	1.00																
C18_0	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	0.08	1.00															
C18_1n9c.t	-	0.19	0.07	0.12	0.40	-	-	0.03	-	0.71	0.42	1.00														
C18_2n6c	0.11	0.55	0.39	0.71	0.22	0.44	0.39	0.28	-	0.76	0.11	0.62	1.00													
C18_3n6	0.40	-	0.11	0.04	-	0.35	0.53	0.12	0.88	-	-	-	-	1.00												
C18_3n3	0.70	0.43	0.35	0.52	-	0.45	0.88	0.51	0.74	-	-	-	0.07	0.84	1.00											
C20_0	0.72	0.41	0.19	0.34	0.45	0.01	0.42	0.53	0.02	-	-	-	-	0.09	0.29	1.00										
C20_1CIS.11	0.56	0.42	0.23	0.18	0.69	-	0.17	0.57	-	0.06	0.03	0.15	-	-	0.02	0.87	1.00									
C20_3n6	0.63	0.52	0.44	0.63	0.00	0.48	0.80	0.57	0.37	0.05	-	-	0.46	0.47	0.73	0.36	0.12	1.00								
C20_4n6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	0.18	-	-	-	-	-	-	1.00							
C20_5n3	0.70	0.18	0.35	0.21	-	0.32	0.68	0.42	0.75	-	-	-	-	0.91	0.89	0.39	0.16	0.57	-	1.00						
SFA	0.68	0.51	0.33	0.70	-	0.60	0.94	0.51	0.69	-	-	-	0.25	0.70	0.94	0.32	0.02	0.76	-	0.76	1.00					
MUFA	-	0.28	0.14	0.18	0.47	-	-	0.14	-	0.74	0.40	0.99	0.64	-	-	-	0.22	0.00	0.11	-	-	1.00				
PUFA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.88	-	-	-	1.00			
Ω3	0.71	0.26	0.36	0.32	-	0.37	0.76	0.46	0.76	-	-	-	-	0.91	0.95	0.37	0.11	0.63	-	0.99	0.84	-	-	1.00		
Ω6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	0.25	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-	0.18	0.85	-	1.00	
Ω6/Ω3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20	0.15	0.46	-	-	-	-	-	-	0.93	-	-	0.40	0.66	-	0.95	1.00

Tabela 3.6 - Estudo estatístico de comparação entre os resultados obtidos para as amostras de *Fucus vesiculosus* que sofreram diferentes tipos de secagem (grupos)

Parâmetro	Teste Levene	Estudo das diferenças entre grupos		Comparação de médias dos grupos (teste Post-hoc) de amostras secas			
	Valor de p	Método aplicado	Valor de p	Sombra	Liofilizada	Estufa	Sol
C8:0	0,17	ANOVA	<0,001	0,017 ± 0,004 a	0,05 ± 0,01 b	0,0120 ± 0,0008 a	0,023 ± 0,001 a
C12:0	0,50	ANOVA	< 0,0001	0,068 ± 0,004 a	0,08 ± 0,01 a	0,044 ± 0,003 b	0,0471 ± 0,01 b
C13:0	0,055	ANOVA	<0,001	0,04 ± 0,01 a	0,16 ± 0,06 b	0,03 ± 0,01 a	n.d. a
C14:0	0,00052	WELCH	<0,001	11,03 ± 0,01 a	11,6 ± 0,6 a	6,9 ± 0,2 b	9 ± 1 c
C14:1	0,76	ANOVA	0,0072	0,08 ± 0,02 ab	0,11 ± 0,01 a	0,09 ± 0,01 a	0,06 ± 0,01 b
C15:0	0,033	WELCH	0,00578	0,49 ± 0,08 a	0,5 ± 0,1 a	0,25 ± 0,02 b	0,4 ± 0,2 ab
C16:0	0,024	WELCH	<0,001	15 ± 2 a	19,4 ± 0,5 b	10,2 ± 0,2 c	16 ± 2 a
C16:1	0,0084	WELCH	<0,001	0,88 ± 0,09 ac	1,6 ± 0,1 b	0,78 ± 0,02 c	0,8 ± 0,5 a
C17:0	0,00014	WELCH	0,00214	0,4 ± 0,2 a	2,5 ± 0,6 b	0,36 ± 0,01 a	8 ± 2 c
C17:1CIS-10	0,58	ANOVA	<0,001	0,30 ± 0,06 a	0,20 ± 0,08 ab	0,13 ± 0,03 b	n.d. c
C18:0	0,43	ANOVA	0,53	1,1 ± 0,2 a	1,07 ± 0,08 a	1,3 ± 0,5 a	1,01 ± 0,09 a
C18:1n9c+t	0,0084	WELCH	<0,001	38 ± 5 a	32,3 ± 0,8 b	36,9 ± 0,6 a	27 ± 2 c
C18:2n6c	0,0021	WELCH	0,0683	8 ± 2 a	7,2 ± 0,6 a	6,1 ± 0,1 a	6,0 ± 0,4 a
C18:3n6	0,0041	WELCH	<0,001	0,24 ± 0,06 a	0,53 ± 0,09 b	0,31 ± 0,02 a	0,70 ± 0,03 c
C18:3n3	0,03	WELCH	<0,001	5,4 ± 0,7 a	8,2 ± 0,4 b	4,4 ± 0,2 a	8,2 ± 0,8 c
C20:0	0,33	ANOVA	0,246	0,11 ± 0,03 a	0,2 ± 0,2 a	0,133 ± 0,003 a	0,14 ± 0,02
C20:1CIS-11	0,42	ANOVA	0,088	0,086 ± 0,04 a	0,3 ± 0,2 a	0,19 ± 0,02 a	0,12 ± 0,07 a
C20:3n6	0,48	ANOVA	0,0688	0,4 ± 0,7 a	0,82 ± 0,02 a	0,08 ± 0,03 a	0,6 ± 0,2 a
C20:4n6	0,001	WELCH	p<0,001	13 ± 10 a	0,07 ± 0,02 b	24,8 ± 0,4 c	8 ± 9 b
C20:5n3	0,079	ANOVA	<0,001	4,4 ± 0,3 a	12,9 ± 0,6 b	6,3 ± 0,2 c	13 ± 1 b
SFA	< 0,001	WELCH	<0,001	28 ± 3 a	35,6 ± 0,6 b	19,2 ± 0,4 c	35 ± 5 b
MUFA	0,12	ANOVA	<0,001	4 ± 5 a	34,5 ± 0,9 a	38,1 ± 0,5 a	28 ± 2 b
PUFA	0,0019	WELCH	>0,001	31 ± 7 a	30 ± 10 a	41,9 ± 0,8 b	37 ± 7 ab
ω ₃	<0,001	WELCH	<0,001	9,8 ± 0,9 a	21,1 ± 0,4 b	10,6 ± 0,4 a	21 ± 2 b
ω ₆	<0,001	WELCH	<0,001	22 ± 8 a	8,5 ± 0,7 b	31,3 ± 0,5 c	16 ± 9 ab
ω ₆ /ω ₃	0,0025	WELCH	<0,001	2,3 ± 0,9 a	0,40 ± 0,03 b	2,94 ± 0,08 a	0,8 ± 0,5 b

Da análise estatística efetuada pode concluir-se que os ácidos gordos C8:0, C12:0, C13:0, C14:1, C17:1CIS10, C18:0, C20:0, C20:1CIS11, C20:3n6, C20:5n3, e MUFA (perfazendo um total de 11 variáveis), apresentaram homogeneidade de variâncias. Também se verificou que as variáveis que não apresentam diferenças significativas são: C18:0, C18:2n6c, C20:0, C20:1CIS11 e C20:3n6. Nas variáveis com diferenças significativas entre as diferentes amostras aplicou-se o teste Post-hoc com objetivo de averiguar quais as amostras cujos valores médios são diferentes. Desta análise conseguiu-se verificar que há 6 tipos de padrão de diferenças entre amostras que estão resumidas na Tabela 3.7, evidenciado pelo agrupamento de letras (letras semelhantes correspondem a amostras cujas médias não são estatisticamente diferentes).

Tabela 3.7 – Padrão de diferenças entre amostras obtidas pelos testes Post-hoc

Variável	Amostras Secas			
	SOMB	LIO	EST	SOL
C12_0	a	a	b	B
C13_0	a	b	a	A
C14_0	a	a	b	C
C14_1	ab	a	a	B
C15_0	a	a	b	Ab
C16_0	a	b	c	A
C16_1	ac	b	c	A
C17_0	a	b	a	C
C17_1CIS-10	a	ab	b	C
C18_0	a	a	a	A
C18_2n6c	a	a	a	A
C18_3n3	a	b	a	C
C18_3n6	a	b	a	C
C20_0	a	a	a	A
C20_1CIS-11	a	a	a	A
C20_3n6	a	a	a	A
C20_4n6	a	b	c	B
C20_5n3	a	b	c	B
C8_0	a	b	a	A
MUFA	a	a	a	B
ω3	a	b	a	B
ω6	a	b	c	Ab
ω6/ω3	a	b	a	B
PUFA	a	a	b	Ab
SFA	a	b	c	B

A Tabela 3.7 permite verificar que as amostras secas à sombra têm 13 variáveis com médias estatisticamente diferentes às das amostras secas por liofilização; 10 variáveis estatisticamente diferentes às das amostras secas por estufa; e 12 variáveis estatisticamente diferentes às das amostras secas ao sol. No caso das amostras liofilizadas as diferenças significativas foram encontradas em 17 variáveis em relação às amostras secas por estufa e 12 variáveis em relação às amostras secas por sol. Também se verifica que nas amostras secas por estufa, 15 variáveis tem médias diferentes em relação às obtidas para as amostras secas por sol.

Os resultados resumidos na Tabela 3.7 mostram que, na globalidade, os métodos de secagem provocam alterações no perfil de ácidos gordos. Apesar das algas não serem uma fonte convencional de energia, devido ao seu baixo conteúdo em lípidos, no entanto possuem um nível significativamente elevado de PUFAs que acaba por ser mais elevado do que o encontrado em vegetais ou plantas terrestres. (Maehre et al., 2014; Sánchez-Machado et al., 2004). Considerando a relevância dos PUFAS, $\omega 3$ e $\omega 6$ para uma dieta alimentar saudável, verificou-se que os tratamentos de secagem que permitiram ter maior conteúdo nestes componentes foram por: estufa e sol para os ácidos gordos PUFA; sol e liofilização para os ácidos gordos $\omega 3$; estufa para os ácidos gordos $\omega 6$. Em relação à variável $\omega 6/\omega 3$, os tratamentos de secagem que mais favoreceram a razão destes conteúdos ($n6/n3 \approx 1$) são por sol e liofilização. No geral, verificou-se que as variações no perfil de ácidos gordos não permitem chegar a uma conclusão definitiva sobre qual o melhor método de secagem. A possibilidade de se usar o sol no processo de secagem das amostras de alga entra um pouco em contradição com o facto de no perfil de ácidos gordos, este processo apresentar em geral os menores valores de concentração. Também, já foi descrito que os efeitos de secagem, principalmente usando o sol podem fazer variar o conteúdo de nutrientes, pois tornam-se um processo onde é difícil controlar as condições (Chan et al., 1997).

De notar, que entre os ácidos gordos identificados está presente o ácido gordo essencial EPA (C20:5n3) que aparece em quantidades mais significativas para os tratamentos por sol e liofilização. Este ácido gordo essencial, juntamente com o DHA, mostraram ter um efeito positivo no atenuar dos factores de risco associados ao desenvolvimento e progresso de Doenças Cardiovasculares (DCVs), em particular na redução da

inflamação. Neste trabalho não foi identificado DHA, mas não podemos afirmar a sua existência ou não, uma vez que não existia na mistura de padrões de referência utilizado para identificar os ácidos gordos. A recomendação aconselhada pela EFSA, para contribuir para a redução de DCVs, para estes dois ácidos gordos é de 250mg/dia. Mas, torna-se difícil alcançar este consumo de EPA, apenas através da fonte de alimentação em algas. No entanto, a inclusão de algas numa dieta equilibrada, acabará por contribuir para alcançar este valor. Para se ter uma ideia, o consumo ideal teria de ser cerca de 130 a 160g de algas, o que é 3 a 4 vezes superior ao consumido diariamente no sul da Coreia.

Numa comparação global do valor médio obtido para os perfis de ácidos gordos da amostra *F. vesiculosus* usada neste trabalho, verificou-se que há uma relação linear (Coeficiente de determinação, $R^2=0,91$) com a composição de ácidos gordos apresentada para a mesma espécie *F. vesiculosus*, estudada por (Maehre et al., 2014), com tratamento por liofilização. Já em relação às algas *L. digitata* e *U. Pinafida*, apesar de também pertencerem ao grupo das algas castanhas, não se obteve qualquer relação entre os resultados de ácidos gordos. Estes resultados confirmam que a percentagem de ácidos gordos presentes nas algas varia com a espécie e que os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os apresentados na literatura (Maehre et al. 2014; MacArtain et al. 2007).

3.3 Voltametria Cíclica

Lavagem. A análise voltamétrica está dependente das condições iniciais da superfície do eléctrodo de trabalho sendo, por isso, um passo muito importante para a precisão e exatidão desta metodologia a lavagem do eléctrodo. A Figura 3.2 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para a solução redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ após repetições das lavagens com as duas soluções referidas, verificando-se uma boa repetibilidade que foi atribuída às condições iniciais da superfície de ouro na análise serem praticamente iguais. Os valores de intensidade de corrente no pico de corrente anódica ($2,39 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-7}$ A) e a do pico de corrente catódica ($2,30 \times 10^{-5} \pm 6 \times 10^{-7}$ A) mostraram variações entre as lavagens de 2,2 e 2,7%, respectivamente. Também se verificou que, a solução redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ originou um voltamograma quasi-reversível pois a razão entre a

intensidade de corrente no pico de corrente anódica e a do pico de corrente catódica obtida foi de $1,04 \pm 0,01$, próxima da unidade (valor teórico para uma reação reversível).

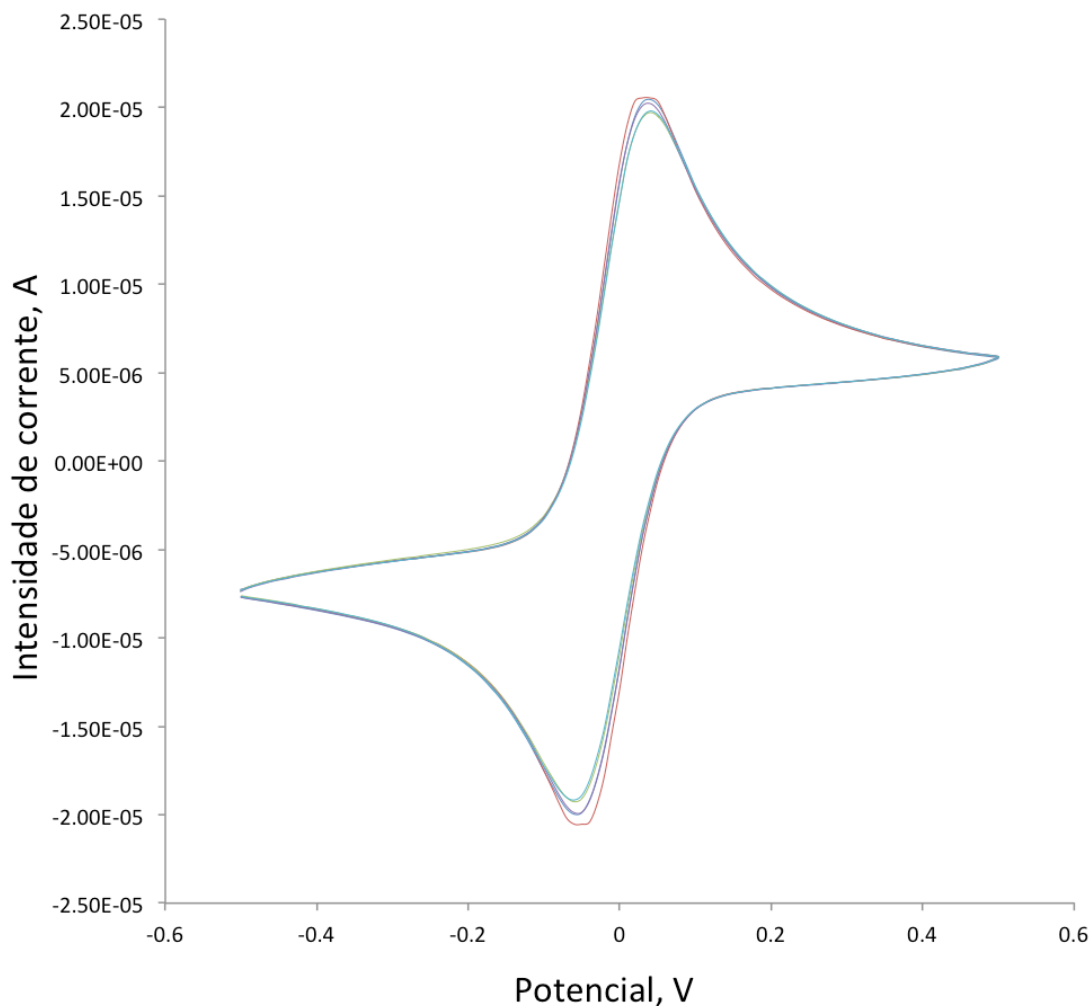


Figura 3.2 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a solução redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ após repetições das lavagens

Calibração. Para a determinação da quantidade de compostos fenólicos que foram extraídos das amostras de algas estabeleceu-se a calibração do equipamento usando 6 soluções de diferentes concentrações de ácido ascórbico. Na Figura 3.3 apresentam-se os voltamogramas cíclicos obtidos para as concentrações de 176 (padrão P5), 352 (padrão P4), 705 (padrão P3), 1409 (padrão P2) e 1761 (padrão P1) mg/L em ácido

ascórbico, preparadas em solução tampão de fosfato (PBS) de pH=7. A figura mostra que a reação do ácido ascórbico é irreversível e, por isso, a calibração foi realizada usando intensidades de corrente do pico anódico. O valor de potencial associado ao valor máximo de intensidade do pico para as soluções padrão de calibração foi, em média, de $0,33 \pm 0,04$ V. Obteve-se uma relação linear entre as concentrações de ácido ascórbico e as respectivas intensidades de corrente dos picos anódicos com um valor de declive de $5,8 \times 10^{-9} \pm 2 \times 10^{-10}$ e ordenada na origem, $1 \times 10^{-7} \pm 3 \times 10^{-7}$. O coeficiente de correlação é razoável ($R=0.995$) mostrando que os pontos experimentais se encontram um pouco afastados da reta ajustada, como se pode verificar na Figura 3.4. Na globalidade, os resultados referidos mostram que a calibração deve ser melhorada em trabalho futuro.

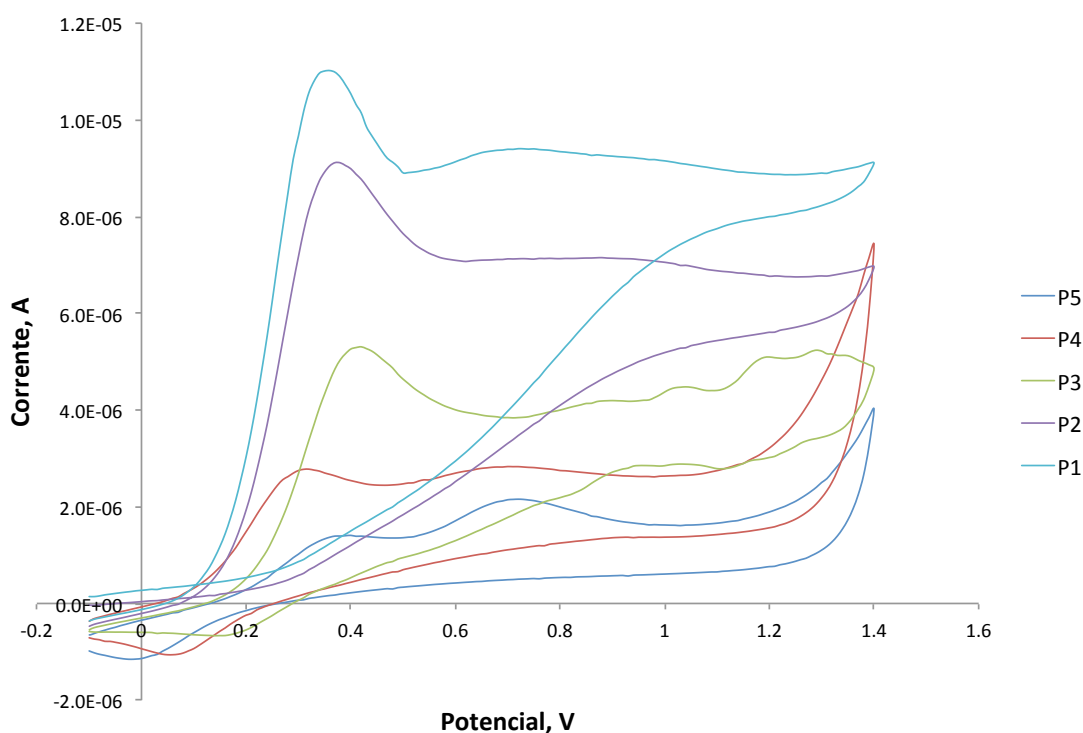


Figura 3. 3 - Voltamogramas cíclicos para soluções com diferentes concentrações de ácido ascórbico.

A solução de controlo de qualidade é uma solução padrão de ácido ascórbico de concentração 1057 mg/L. As análises voltamétricas a esta solução foram efectuadas em triplicado e o valor médio obtido foi de 1121 ± 18 mg/L. A precisão das análises é boa

($sr\%=1,6\%$) mas, ao nível da exatidão, o resultado não foi o esperado pois o valor do erro relativo percentual foi de $6,0\%$.

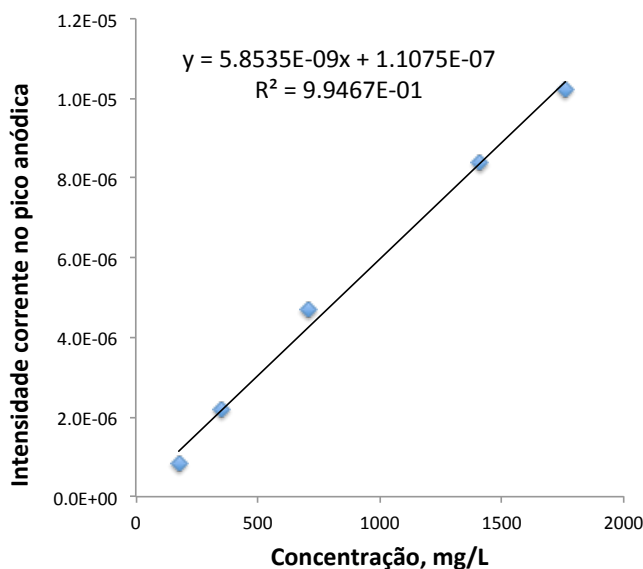


Figura 3.4 - Relação linear obtida na calibração com o ácido ascórbico usando as intensidades de corrente do pico anódico.

Análise das amostras. Os voltamogramas cíclicos obtidos para as 4 amostras analisadas (3 réplicas) parecem mostrar que os tratamentos efetuados não alteram muito a quantidade de compostos fenólicos extraídos (Figura 3.5). O Voltamograma cíclico é típico em todas as amostras e mostra que a reação não é reversível. Verificou-se que a concentração de compostos fenólicos no extrato inicial para as diferentes amostras secas varia entre 162 e o 212mg equivalentes de ácido ascórbico por grama de amostra seca. Na Figura 3.6 mostra-se a representação gráfica Boxplot dos resultados obtidos para cada grupo de amostras secas com diferentes tipos de tratamento. Nestes ensaios preliminares obteve-se uma concentração média de compostos fenólicos de: 177 ± 5 mg equivalentes de ácido ascórbico por grama de amostra seca à sombra; 168 ± 6 mg equivalentes de ácido ascórbico por grama de amostra seca ao sol; 198 ± 12 mg equivalentes de ácido ascórbico por grama de amostra seca no liofilizador; 73 ± 7 mg equivalentes de ácido ascórbico por grama de amostra seca na estufa. Através de ANOVA de 1 factor, verifica-se que há diferenças significativas entre amostras dos 4

tratamentos de conservação (valor- $p=0.015$) ao nível dos conteúdos em compostos fenólicos.

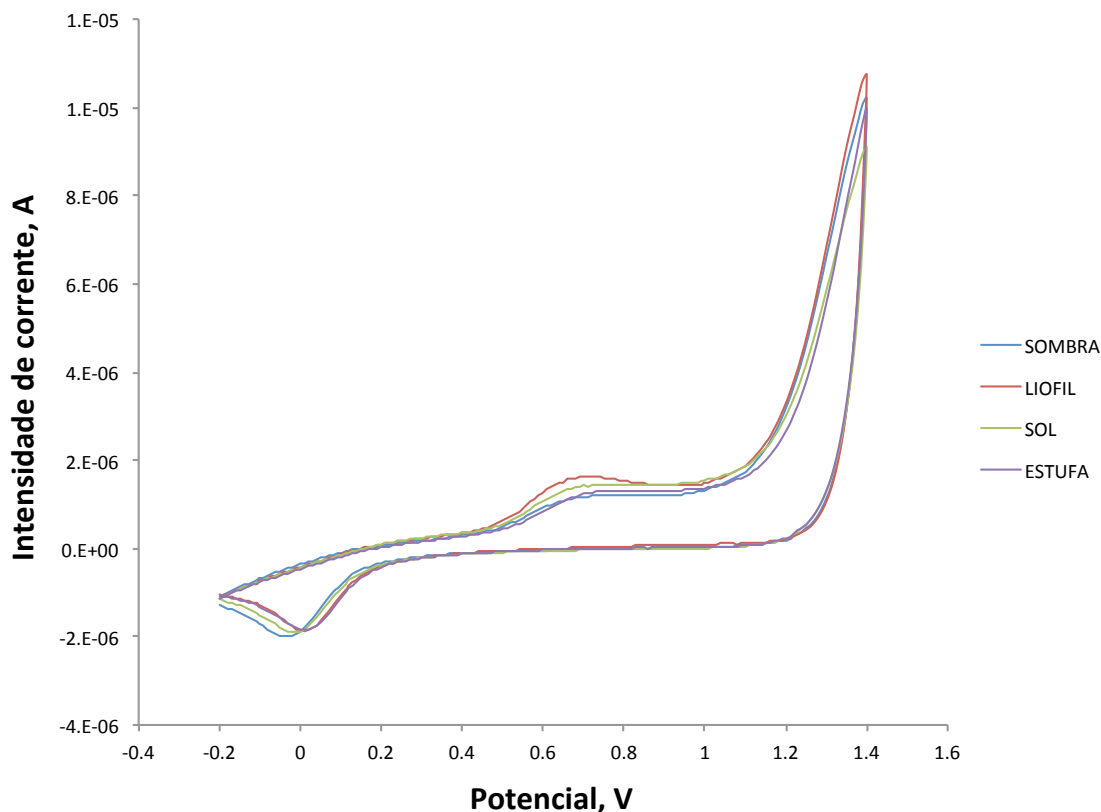


Figura 3.5 - Voltamogramas cíclicos obtidos para as 4 amostras secas de algas analisadas.

Para verificar quais as médias com diferenças significativas, aplicou-se o teste tukey que mostrou que, ao nível de significância de 5%, as amostras secas por liofilização têm uma média diferente das amostras secas com estufa (valor de $p=0,037$) e ao sol (valor de $p=0,014$). A Figura 8 mostra os resultados associados ao teste Tukey na forma de um gráfico, onde se representam os intervalos de confiança a 95% das diferenças entre as médias de cada comparação. De realçar que, embora electroquimicamente os resultados sejam semelhantes não quer dizer que não tenham ocorrido transformações ao nível da sua composição. Já foi verificado que o conteúdo em carotenóides pode ser mais baixo na alga liofilizada (Jiménez-Escrig et al., 2001) e que os polifenóis são mais afectados em estufa (Jiménez-Escrig et al., 2001; Zaragoza et al., 2008).

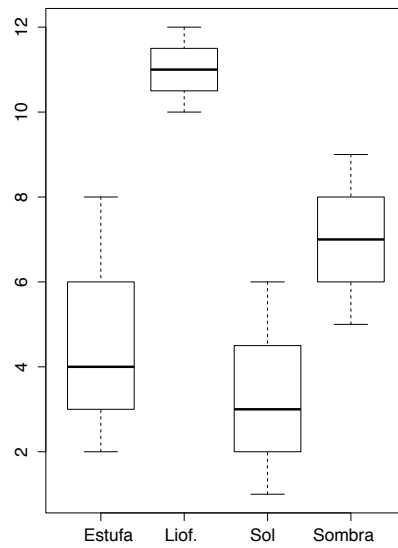


Figura 3.6 - Boxplot das concentrações em compostos fenólicos para cada grupo de amostras secas com diferentes tipos de tratamento.

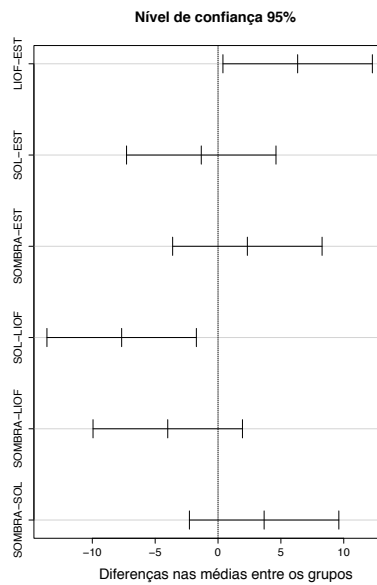


Figura 3.7 - Intervalos de confiança a 95% das diferenças entre as médias de cada comparação.

Ao nível do poder antioxidante verificou-se que nos extratos das amostras referentes aos quatro processos de secagem, o potencial correspondente à intensidade máxima do pico

anódico tinha um valor global médio de $0,61 \pm 0,05V$. Verificou-se que este valor é superior ao obtido para as soluções de ácido ascórbico ($0,33 \pm 0,04V$), sendo indicativo que os compostos fenólicos extraídos das amostras secas mostram menor poder antioxidante.

Os resultados obtidos neste estudo são aceitáveis e comparáveis com os obtidos em outros estudos, por exemplo, os voltagramas cíclicos apresentados num estudo de compostos fenólicos em plantas, mostraram picos a variar entre 0,235 e 0,834V (Yakovleva et al., 2007). Também, num estudo de voltametria com uvas brancas, verifica-se a existência de 3 picos anódicos que possuem variações entre 0,26 e 0,34V (Jara-palacios et al., 2014).

4 Considerações Finais

Apesar das algas não fazerem parte da alimentação diária dos Portugueses, existe uma vasta gama de espécies na nossa costa litoral que seria interessante explorar para a utilização tanto em suplementos, aditivos ou na alimentação diária como parte de um estilo de vida saudável. A informação recolhida neste trabalho relativa ao valor nutricional está de acordo com a obtida em outros estudos com a mesma alga, ou para algas da mesma espécie. Pode considerar-se que, a alga *Fucus vesiculosus* possui interesse nutricional e vários benefícios para a saúde, uma vez que podem acrescentar uma fonte nutricional de minerais, PUFA's e antioxidantes, ou ser utilizadas como substituinte do sal nas dietas ocidentais. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a alga estudada apresentava níveis elevados de fibra e minerais, tais como cálcio, sódio, potássio e ferro, quando comparados com outras fontes alimentares, consideradas ricas nestes minerais e um valor de proteína próximo do encontrado em leguminosas. Foi ainda possível concluir que, o perfil de ácidos gordos sofreu variação consoante o método de secagem, no entanto, seria necessário fazer mais repetições de preferência com condições de secagem mais controladas. Adicionalmente, os resultados preliminares efectuados com voltametria cíclica evidenciam que os extratos etanólicos da alga sujeita a diferentes processos de secagem possuem um conteúdo considerável em compostos fenólicos. No entanto, estes resultados necessitam ainda de uma posterior consolidação.

Assim, como conclusão geral, este trabalho permitiu iniciar o estudo da informação nutricional da *F. vesiculosus* da zona litoral/Aveiro com vista a obter informação sobre compostos bioativos, considerada relevante para estabelecer comparações com futuros trabalhos de algas da costa litoral portuguesa. O trabalho pode ser considerado preliminar por ter testado várias metodologias que não estavam estabelecidas para este tipo de amostra. Neste âmbito também se pode considerar importante complementar com outros estudos como a variação da composição em aminoácidos, açúcares, fibra solúvel/ insolúvel, vitaminas e carotenóides. É ainda de salientar a importância de tornar mais abrangente este estudo, englobando a sazonalidade e local de recolha pois, como é sabido, as características químicas da alga dependem destes factores.

Referências Bibliográficas

- Agriculture, U. S. D. of, & Services, U. S. D. of H. and H. (2010). Dietary Guidelines 2010.
- Anonymous (2006). Food and Nutrition Board, Recommended Dietary Allowances, 12th ed. *National Academy Press*, Washington, DC.
- Besada, V., Andrade, J. M., Schultze, F., & González, J. J. (2009). Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. *Journal of Marine Systems*, 75(1-2), 305–313.
- Bilan, M. I.; Grachev, A. A.; Shashkov, A. S.; Nifantiev, N. E.; Usov, A. I. (2006). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydr. Res.*, 341(2), 238–245.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S., & Sánchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of medicinal food*, 12(2), 236–258.
- Burtin, P. (2003). Nutritional Value of Seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(4), 1579–4377.
- Campos, F. P. de; Nussio, C. M. B.; Nussio, L. G. (2004). Métodos de análise de alimentos. Piracicaba: FEALQ, 135p.
- Cardoso, S., Carvalho, L., Silva, P., Rodrigues, M., Pereira, O., & Pereira, L. (2014). Bioproducts from Seaweeds: A Review with Special Focus on the Iberian Peninsula. *Current Organic Chemistry*, 18(7), 896–917.
- Chan, C. C., Cheung, C. K., & Ang, P. O. (1997). Comparative Studies on the Effect of Three Drying Methods on the Nutritional Composition of Seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45, 3056–3059.
- Chevolot, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A., & Collic-Jouault, S. (2001). A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*, 330, 529–535.
- Connor, W. E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin*

Nutr., 71(3), 1–5.

Christie W. W. (1993), Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis, Oily Press, Dundee, UK.

Darcy-Vrillon, B. (2004). Nutritional aspects of the developing use of FAO, Highlights of special studies. In: *The state of world fisheries and aquaculture*; FAO: Sofia.

D’Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M. A., De Girolamo, M., Ficoneri, C., & Riccioni, G. (2012). Fucoxantin: A treasure from the sea. *Marine Drugs*, 10, 604–616.

FAO/WHO/UNU, Amino acid scoring patterns, disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/004/m3013e/m3013e00.htm> (consultado em Maio de 2015).

FAO. Highlights of special studies. In: *The state of world fisheries and aquaculture 1215 2004*; FAO: Sofia, 2004. 1216

FAO/WHO/UNU, Amino acid scoring patterns. [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/004/m3013e/m3013e00.htm> (acedido em Maio, 2015).

Fleurence, J. (1999a). Seaweed proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 25–28.

Fleurence, J. (1999b). Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 25–28.

Fung, A., Hamid, N., & Lu, J. (2013). Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry*, 136(2), 1055–1062.

Gómez-Ordóñez, E., Jiménez-Escrig, A., & Rupérez, P. (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43(9), 2289–2294.

Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 315–326.

Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K. (2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*, 47(12), 1691–1698.

- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597.
- Hou, X. L.; Yan, X. J. (1998). Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *Sci. Total Environ.*, (222), 141-156.
- Hur, S. J., Ye, B. W., Lee, J. L., Ha, Y. L., Park, G. B., & Joo, S. T. (2004). Effects of conjugated linoleic acid on color and lipid oxidation of beef patties during cold storage, *Meat Sci.*, 66, 771–775.
- Institute of Medicine. (2005). *Dietary Fat: total fat and fatty acids. Dietary Reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids*. The National Academic Press, Washington
- Jara-palacios, M. J., Hernanz, D., Escudero-gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *FRIN*, 66, 150–157.
- Jeevitha, M., Athiperumalsami, T., & Kumar, V. (2013). Dietary fibre, mineral, vitamin, amino acid and fatty acid content of seagrasses from Tuticorin Bay, Southeast coast of India. *Phytochemistry*, 90, 135–146.
- Jiménez-Escrig, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2000). Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research*, 20(4), 585–598.
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 530–534.
- Kanda, H., Kamo, Y., Machmudah, S., Wahyudiono, & Goto, M. (2014). Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether. *Marine Drugs*, 12, 2383–2396.
- Mahan, K. L., Escott-Stump, S. (2008). *Nutrition and Dietetics*. Elsevier, Saunders, USA, Missouri.
- Kim, K. T., Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2014). Alpha-amylase and alpha-

- glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27–33.
- Kim, M. S., Kim, J. Y., Choi, W. H., & Lee, S. S. (2008). Effects of seaweed supplementation on blood glucose concentration, lipid profile, and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition research and practice*, 2, 62–67.
- Kim SE-kwon. (2011). *Advances in Food and Nutrition REsearch - Marine Medicinal Foods*.
- Kumar, S. A., & Brown, L. (2013). Seaweeds as potential therapeutic interventions for the metabolic syndrome. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 14, 299–308.
- Kumari, P., Kumar, M., Gupta, V., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2010). Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry*, 120(3), 749–757.
- Lahaye, M. (1998). NMR spectroscopic characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. *Carbohydrate Research*, 314, 1–12.
- Le Lann, K., Jégou, C., & Stiger-Pouvreau, V. (2008). Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycological Research*, 56(4), 238–245.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126.
- Leonel, P. (2010). *Littoral of Viana do Castelo - ALGAE: Uses in agriculture, gastronomy and food industry (Bilingual)*. Viana do Castelo: Câmara Municipal de Viana do Castelo.
- Li, Y., Wijesekara, I., Li, Y., & Kim, S. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46(12), 2219–2224.
- Li, B.; Lu, F.; Wei, X.J.; Zhao, R.X. (2008). Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, 13(8), 1671-1695.

- Mabeau, S. & F. J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 4, 103-107.
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I. R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition reviews*, 65(December), 535–543.
- Maehre, H. K., Malde, M. K., Eilertsen, K.-E., & Elvevoll, E. O. (2014). Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(15), 3281–90.
- McHugh, D.J. (2003). *A Guide to the Seaweed Industry*; FAO Fisheries Technical Paper 441: Rome.
- Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanzpour, Z., Waaland, J. R., Rabiei, R. (2012). Fatty Acids, Amino Acids, Mineral Contents, and Proximate Composition of Some Brown Seaweeds, 292, 285–292.
- Mišurcová, L., Buňka, F., Vávra Ambrožová, J., Machů, L., Samek, D., & Kráčmar, S. (2014). Amino acid composition of algal products and its contribution to RDI. *Food Chemistry*, 151, 120–125.
- Morales, F. J., & Jime, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fuorescence, *Food Chemistry*, 72, 119–125.
- Murata, M.; Nakazoe, J. (2001) Production and use of marine algae in Japan. *Jpn. Agr. Res. Q.*, (35), 281–290.
- Ngo, D. H., Wijesekara, I., Vo, T. S., Van Ta, Q., & Kim, S. K. (2011). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*, 44(2), 523–529.
- Decreto-lei Europeu (1997). *Jornal Oficial n° L 043 de 14/02/1997*, 1–6.
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A., Rios, A. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry*, 99, 98–104.
- Pereira, L. (2008). As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. *Monografias*, 913, 1–19.

- Pereira, L. (2012). A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In: *Seaweed*; Pomin V. H., Ed.; Nova Science Publishers Inc: New York; pp. 15-47.
- Pereira, L., Gheda, S. F., & Ribeiro-claro, P. J. A. (2013). Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013(vi), 1–7.
- Pereira, L., & van de Velde, F. (2011). Portuguese carrageenophytes: Carrageenan composition and geographic distribution of eight species (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 614–623.
- Pereira, L. MACOI, Portuguese seaweeds, disponível em: <http://macoi.ci.uc.pt/> (consultado em Setembro, 2015)
- Regulamento (CE) N.º 1881/2006 DA COMISSÃO de 19 de Dezembro de 2006
- Rupérez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23–26.
- Rupérez, P., Ahrazem, O., & Leal, A. J. (2002). Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 840–845.
- Salman A., Ferreira A., Soares J., Souza J. (2010). Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. Documentos 136, Maio 2010. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestral de Rondônia; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J., & Paseiro-Losada, P. (2004). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*, 85, 439–444.
- Seaweed Industry Association, disponível em: <https://seaweedindustry.com>, (consultado em Julho de 2015).
- Simopoulos, a. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(8), 365–379.
- Sousa-Pinto, I.; Abreu, H. (2006) The seaweed resources of Portugal. In: *World Seaweed Resources: an authoritative reference system*; Critchley A.T. Ohno, M.,

and Largo D.,Eds.; ETI 1218 Information.

Tabela da Composição de Alimentos (2007).Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 1ª ed. Lisboa, 2007

Teas, J., Pino, S., Critchley, A., Braverman, L.E. (2004). Variability of iodine content in common commercially available edible seaweeds. *Thyroid*, *14*, 836-841.

Terasaki, M., Hirose, A., Narayan, B., Baba, Y., Kawagoe, C., Yasui, H., Saga, N., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2009). Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents. *J. Phycol.*, *45*(4), 974-980.

Teow, C. C., Truong, V., Mcfeeters, R. F., Thompson, R. L., Pecota, K. V, & Yencho, G. C. (2007). Food Chemistry Antioxidant activities , phenolic and b -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours, *103*, 829–838.

Value Added Products from Macroalgae Sarah Hotchkiss CyberColloids , Ireland, disponível

em:http://nordicinnovation.org/Documents/Attachments/NordicAlgaeNetwork_MarineProject/Sarah%20Hotchkiss%20Value%20Added%20Products%20from%20Macroalgae_isl2012.pdf (acedido em Outubro de 2015).

Wu, K., Xie, Y., & Zhao, J. (1999). Photo-Fenton degradation of a dye under visible light irradiation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *144*(1), 77–84.

Yakovleva, K. E., Kurzeev, S. A., Stepanova, E. V., Fedorova, T. V., Kuznetsov, B. A., & Koroleva, O. V. (2007). Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *43*(6), 661–668.

Zaragozá, M. C., López, D., Sáiz, M., Poquet, M., Pérez, J., Puig-Parellada, P., Màrmol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y., Burtin, P., Inisan, C., Rousseau, I., Besnard, M., Mitjavila, M. T. (2008). Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. *J Agric Food Chem*, *56*, 7773–7780.

Zenebron, O., Pascuet, N. S., Tiglea, P. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. 1018 p. (Série A – Normas e Manuais Técnicos).

Anexo I – Mistura de padrões utilizada para identificação dos ácidos gordos

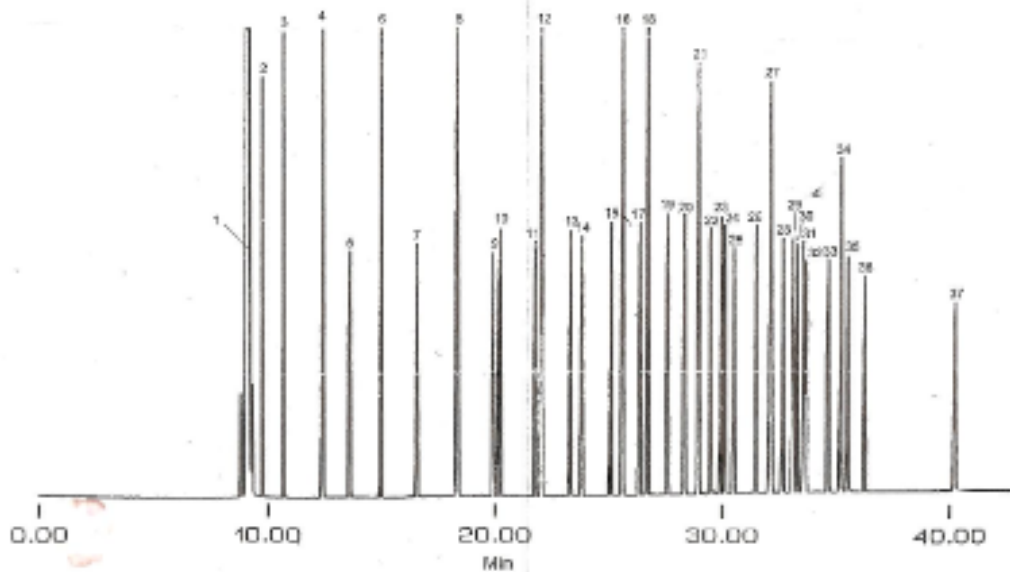
This Data Sheet Contains Important Information About The Product.

Supelco™ 37 Component FAME Mix Catalog No. 47885-U

This fatty acid methyl ester (FAME) mixture is carefully prepared by weight. The weight percentage of each component is indicated. Each ampule contains 10mg/mL of the FAME reference standard mix in methylene chloride.

Column: SP™-2566, 100m x 0.25mm ID, 0.20µm film
Cat. No.: 34058
Oven: 140°C (5 min) to 240°C at 4°C/min
Carrier: helium, 20cm/sec
Det.: FID, 360°C
Inj.: 1µL, 260°C, split 100:1

Component	Weight %
1. Rubric Acid Methyl Ester (C14:1)	4%
2. Caproic Acid Methyl Ester (C6:0)	4%
3. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0)	4%
4. Capric Acid Methyl Ester (C10:0)	4%
5. Undecanoic Acid Methyl Ester (C11:0)	3%
6. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0)	3%
7. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0)	3%
8. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0)	4%
9. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1)	2%
10. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0)	2%
11. cis-10-Pentadecenoic Acid Methyl Ester (C15:1)	2%
12. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0)	6%
13. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1)	2%
14. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0)	2%
15. cis-10-Heptadecenoic Acid Methyl Ester (C17:1)	2%
16. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0)	4%
17. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n-7)	2%
18. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n-6)	4%
19. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n-6)	2%
20. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n-7)	2%
21. Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0)	4%
22. γ-Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n-6)	2%
23. cis-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1)	2%
24. Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n-3)	2%
25. Heneicosanoic Acid Methyl Ester (C21:0)	2%
26. cis-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2)	2%
27. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0)	4%
28. cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C22:3n-6)	2%
29. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1n-9)	2%
30. cis-11,14,17-Tricosatrienoic Acid Methyl Ester (C23:3n-6)	2%
31. Arachidonic Acid Methyl Ester (C20:4n-6)	2%
32. Tricosanoic Acid Methyl Ester (C23:0)	2%
33. cis-13,16-Docosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2)	2%
34. Lignoceric Acid Methyl Ester (C24:0)	4%
35. cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester (C20:5n-3)	2%
36. Nervonic Acid Methyl Ester (C24:1)	2%
37. cis-4,7,10,13,16-Docosapentaenoic Acid Methyl Ester (C22:5n-3)	2%



Supelco
from Sigma-Aldrich Co.

198-0472
SUPELCO
Bellefonte, PA

Anexo II - Dose de ingestão de referência recomendadas para minerais

Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Intakes for Individuals, Elements

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies

Life Stage Group	Calcium (mg/d)	Chromium (µg/d)	Copper (µg/d)	Fluoride (mg/d)	Iodine (µg/d)	Iron (mg/d)	Magnesium (mg/d)	Manganese (mg/d)	Molybdenum (µg/d)	Phosphorus (mg/d)	Selenium (µg/d)	Zinc (mg/d)	Potassium (g/d)	Sodium (g/d)	Chloride (g/d)	
<i>Infants</i>																
0-6 mo	210*	0.2*	200*	0.01*	110*	0.27*	30*	0.003*	2*	100*	15*	2*	0.4*	0.12*	0.18*	
7-12 mo	270*	5.5*	220*	0.5*	130*	11	75*	0.6*	3*	275*	20*	3	0.7*	0.37*	0.57*	
<i>Children</i>																
1-3 y	500*	11*	340	0.7*	90	7	80	1.2*	17	460	20	3	3.0*	1.0*	1.5*	
4-8 y	800*	15*	440	1*	90	10	130	1.5*	22	500	30	5	3.8*	1.2*	1.9*	
<i>Males</i>																
9-13 y	1,300*	25*	700	2*	120	8	240	1.9*	34	1,250	40	8	4.5*	1.5*	2.3*	
14-18 y	1,300*	35*	890	3*	150	11	410	2.2*	43	1,250	55	11	4.7*	1.5*	2.3*	
19-30 y	1,000*	35*	900	4*	150	8	400	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.5*	2.3*	
31-50 y	1,000*	35*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.5*	2.3*	
51-70 y	1,200*	30*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.3*	2.0*	
> 70 y	1,200*	30*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.2*	1.8*	
<i>Females</i>																
9-13 y	1,300*	21*	700	2*	120	8	240	1.6*	34	1,250	40	8	4.5*	1.5*	2.3*	
14-18 y	1,300*	24*	890	3*	150	15	360	1.6*	43	1,250	55	9	4.7*	1.5*	2.3*	
19-30 y	1,000*	25*	900	3*	150	18	310	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.5*	2.3*	
31-50 y	1,000*	25*	900	3*	150	18	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.5*	2.3*	
51-70 y	1,200*	20*	900	3*	150	8	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.3*	2.0*	
> 70 y	1,200*	20*	900	3*	150	8	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.2*	1.8*	
<i>Pregnancy</i>																
14-18 y	1,300*	29*	1,000	3*	220	27	400	2.0*	50	1,250	60	12	4.7*	1.5*	2.3*	
19-30 y	1,000*	30*	1,000	3*	220	27	350	2.0*	50	700	60	11	4.7*	1.5*	2.3*	
31-50 y	1,000*	30*	1,000	3*	220	27	360	2.0*	50	700	60	11	4.7*	1.5*	2.3*	
<i>Lactation</i>																
14-18 y	1,300*	44*	1,300	3*	290	10	360	2.6*	50	1,250	70	13	5.1*	1.5*	2.3*	
19-30 y	1,000*	45*	1,300	3*	290	9	310	2.6*	50	700	70	12	5.1*	1.5*	2.3*	
31-50 y	1,000*	45*	1,300	3*	290	9	320	2.6*	50	700	70	12	5.1*	1.5*	2.3*	

NOTE: This table presents Recommended Dietary Allowances (RDAs) in **bold type** and Adequate Intakes (AIs) in ordinary type followed by an asterisk (*). RDAs and AIs may both be used as goals for individual intake. RDAs are set to meet the needs of almost all (97 to 98 percent) individuals in a group. For healthy breastfed infants, the AI is the mean intake. The AI for other life stage and gender groups is believed to cover needs of all individuals in the group, but lack of data or uncertainty in the data prevent being able to specify with confidence the percentage of individuals covered by this intake.

SOURCES: *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride (1997); Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline (1998); Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids (2000); Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc (2001); and Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate (2004).* These reports may be accessed via <http://www.nap.edu>.

Copyright 2004 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.